

Aus dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

DISSERTATION

Charakterisierung der molekularen und zellulären Mechanismen in der  
Entwicklung einer murinen T-Zell-Leukämie

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Edward Georg Michaelis

aus Bonn

Datum der Promotion: 08.12.2017



# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis .....  | I         |
| Abstrakt .....  | IV        |
| 1. Einleitung .....   | 1         |
| <b>1.1. Die T-Zellentwicklung .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1.1. Vom Vorläufer zur reifen T-Zelle .....   | 1         |
| 1.1.2. Wichtige Schritte in der thymischen T-Zellentwicklung .....  | 2         |
| 1.1.3. Der Notch Signalweg steuert die frühen Phasen der T-Zellentwicklung .....  | 4         |
| 1.1.4. <i>T-Cell Leukemia 1</i> (TCL1) ist ein wichtiger Faktor für das Überleben von DN und DP T-Zellen in der T-Zellentwicklung ..... | 5         |
| 1.1.5. Das Chemokinsystem steuert die Migration von T-Zellen während ihrer Entwicklung und Reifung .....                                | 6         |
| <b>1.2. Humane T-Zell-Leukämien .....</b>   | <b>7</b>  |
| 1.2.1. Adulte T-Zell-Leukämie/Lymphom (ATLL) .....  | 7         |
| 1.2.2. T-Zell Prolymphozytische Leukämie (T-PLL) .....  | 8         |
| 1.2.3. Sézary Syndrom .....   | 8         |
| 1.2.4. T-Zell Akute Lymphoblastische Leukämie/Lymphom (T-ALL) .....   | 8         |
| <b>1.3. Mechanismen der Entartung von T-Zellen .....</b>  | <b>9</b>  |
| 1.3.1. <i>notch1</i> als Onkogen in der Entwicklung von T-ALL .....   | 9         |
| 1.3.2. TCL1 und der PI3K-Akt Signalweg in der Entstehung von T-Zell Neoplasien .....  | 11        |
| 1.3.3. Die Rolle der Mikroumgebung in der Entstehung von T-Zell Neoplasien .....  | 12        |
| <b>1.4. Fragestellung .....</b>   | <b>14</b> |
| 2. Material und Methoden .....  | 15        |
| <b>2.1. Material .....</b>  | <b>15</b> |
| 2.1.1. Chemikalien .....  | 15        |
| 2.1.2. Puffer .....   | 15        |
| 2.1.3. Antikörper und Streptavidin-Konjugate .....  | 16        |
| 2.1.4. Rekombinante Proteine .....  | 18        |
| 2.1.5. Kits .....   | 18        |
| 2.1.6. Geräte und Verbrauchsmaterialien .....   | 18        |
| 2.1.7. Software .....   | 20        |
| <b>2.2. Zellbiologische Methoden .....</b>  | <b>20</b> |
| 2.2.1. Isolierung von Lymphozyten .....   | 20        |
| 2.2.2. Zählen der Zellen .....  | 20        |
| 2.2.3. Zellen einfrieren und auftauen .....   | 21        |
| 2.2.4. Durchflusszytometrie .....   | 21        |
| 2.2.5. Fluoreszenz gestütztes Zellsortieren (FACS) .....  | 21        |
| 2.2.6. Chemotaxis Assay .....   | 22        |
| <b>2.3. Tierexperimentelle Methoden .....</b>   | <b>22</b> |

## Inhaltsverzeichnis

---

|   |           |
|---|-----------|
| 2.3.1. Mäuse .....  | 22        |
| 2.3.2. Retrobulbäre Blutentnahme .....  | 22        |
| 2.3.3. Langzeit T-Leukämiezell Transfer .....   | 23        |
| 2.3.4. Migrationsexperimente .....  | 23        |
| 2.3.5. Kompetitiver Transfer von DP und EP T-Leukämiezellen .....   | 23        |
| <b>2.4. Histologische Methoden .....</b>  | <b>24</b> |
| 2.4.1. Gefrierschnitte .....  | 24        |
| 2.4.2. Paraffinfixierte Schnitte .....  | 24        |
| <b>2.5. Molekularbiologische Methoden .....</b>   | <b>25</b> |
| 2.5.1. Isolation von RNA .....  | 25        |
| 2.5.2. Isolation genomischer DNA .....  | 25        |
| 2.5.3. Quantifizierung von DNA und RNA sowie Messung der Qualität .....   | 26        |
| 2.5.4. Reverse Transcriptase-Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) .....  | 26        |
| 2.5.5. Polymerase Ketten Reaktion zum Nachweis von <i>notch1</i> Deletionen .....   | 26        |
| 2.5.6. Quantitative Real Time PCR (qPCR) .....  | 27        |
| <b>3. Ergebnisse .....</b>  | <b>28</b> |
| <b>3.1. Die <i>Eμ-Tcl1</i>/BCR<sup>HEL</sup> Maus .....</b>   | <b>28</b> |
| 3.1.1. Die <i>Eμ-Tcl1</i> /BCR <sup>HEL</sup> Maus zeigt keine BCR <sup>HEL</sup> positive B-Zell-Leukämie .....                  | 28        |
| 3.1.2. <i>Eμ-Tcl1</i> /BCR <sup>HEL</sup> Mäuse zeigen eine malignitätsverdächtige T-Zell Proliferation .....                     | 29        |
| <b>3.2. Die T-Zellproliferation im <i>Eμ-Tcl1</i>/BCR<sup>HEL</sup> Mausstamm ist maligne .....</b>                               | <b>30</b> |
| 3.2.1. Malignitätsverdächtige T-Zellen sind zur Proliferation in immunkompetenten Mäusen fähig .....                              | 30        |
| 3.2.2. <i>Eμ-Tcl1</i> /BCR <sup>HEL</sup> Mäuse zeigen eine monoklonale T-Zell-Leukämie .....                                     | 32        |
| <b>3.3. T-Zellen im <i>Eμ-Tcl1</i>/BCR<sup>HEL</sup> und im <i>Eμ-Tcl1</i> Mausstamm sind zur Expression von TCL1 fähig .....</b> | <b>33</b> |
| <b>3.4. Die T-Leukämiezellen zeigen einen unreifen CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Phänotyp .....</b>                             | <b>35</b> |
| 3.4.1. CD4/8 doppelt positive T-Leukämiezellen tragen CCR7 und CD62L .....  | 35        |
| 3.4.2. Die Ausprägung des DP T-Leukämie Phänotyps variiert .....  | 36        |
| <b>3.5. Die T-Leukämiezellen migrieren zur T-Zell-Zone von Lymphknoten und Milz .....</b>   | <b>37</b> |
| 3.5.1. T-Leukämiezellen zeigen in vitro funktionelle Chemokinrezeptoren .....   | 37        |
| 3.5.2. In-vivo migrieren T-Leukämiezellen zur T-Zell-Zone von Milz und Lymphknoten und akkumulieren an der T:B Zonengrenze .....  | 37        |
| 3.5.3. Transfer in <i>plt/plt</i> Mäuse .....   | 40        |
| <b>3.6. Der Thymus als möglicher Ursprungsort der T-Leukämiezellen .....</b>  | <b>41</b> |
| 3.6.1. Der Thymus unterstützt die Expansion von CD4/8 DP T-Leukämiezellen gegenüber CD4 EP T-Leukämiezellen .....                 | 41        |
| 3.6.2. DP T-Leukämiezellen tragen Marker verschiedener Thymozytenpopulationen .....   | 43        |
| <b>3.7. T-Leukämiezellen zeigen Charakteristika reifer T-Helferzellen und unreifer Thymozyten .</b>                               | <b>44</b> |
| <b>3.8. RNA Analysen zeigen keine Stimulation des PI3K-Akt Signalwegs .....</b>   | <b>47</b> |
| <b>3.9. DP T-Leukämiezellen zeigen eine Fehlregulation des Notch Signalweges .....</b>  | <b>48</b> |

---

|  |           |
|--|-----------|
| 3.9.1. Im RT <sup>2</sup> Profiler PCR Array zeigt sich eine Aktivierung des Notch Signalwegs .....  | 48        |
| 3.9.2. T-Leukämiezellen zeigen verstärkte immunhistochemische Färbung für die intrazelluläre Domäne von NOTCH1 (NIZD1) .....                                 | 51        |
| 3.9.3. Typ 1 und Typ 2 Deletionen des <i>notch1</i> Gens liegen in T-Leukämiezellen nicht vor.....   | 52        |
| 4. Diskussion .....  | 55        |
| <b>4.1. Identität der T-Zell-Leukämie .....</b>  | <b>55</b> |
| 4.1.1. Malignität .....  | 56        |
| 4.1.2. Der Phänotyp der T-Leukämiezellen im Vergleich zu gesunden T-Zellen .....   | 57        |
| 4.1.3. Parallelen zu humanen T-Zell-Leukämien.....   | 59        |
| <b>4.2. Ursprung der T-Zell-Leukämie .....</b>   | <b>60</b> |
| 4.2.1. Der Thymus ist der wahrscheinlichste Ursprungsort der DP T-Leukämiezellen.....  | 60        |
| <b>4.3. Mechanismen der Transformation.....</b>  | <b>61</b> |
| 4.3.1. <i>tcl1</i> als T-Zell Onkogen .....  | 62        |
| 4.3.2. <i>notch1</i> als zentrales Onkogen der <i>Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup></i> T-Zell-Leukämie.....   | 64        |
| <b>4.4. Bedeutung der Stromazellinteraktion für die Onkogenese .....</b>   | <b>67</b> |
| <b>4.5. Verminderte Konkurrenz durch maligne B-Zellen unterstützt die Entstehung von T-Zell-Leukämien in der <i>Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup></i> Maus .....</b> | <b>70</b> |
| <b>4.6. Ausblick .....</b>   | <b>75</b> |
| 5. Literaturverzeichnis.....   | 76        |
| Lebenslauf.....  | 90        |
| Eidesstattliche Versicherung .....   | 91        |
| Danksagung .....   | 92        |

# Abstrakt

Maligne Neoplasien des blutbildenden Systems stellen, trotz großer Fortschritte in deren Behandlung, weiterhin lebensbedrohliche Erkrankungen dar. Die T-Zell Leukämien bilden auf Grund ihrer Seltenheit eine besondere Herausforderung. In der malignen Transformation von T-Zellen spielt die Abwandlung physiologischer Proliferationsreize eine entscheidende Rolle. Zudem spielt in der Onkogenese die Interaktion von Tumorzellen mit der Mikroumgebung eine Rolle. In dieser Arbeit konnten diese Mechanismen anhand einer spontan entstehenden T-Zell Leukämie in der E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup> Maus untersucht und erweitert werden.

Die doppelt-transgene E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup> Maus wurde gezüchtet, um eine Antigen-induzierte Aktivierung und Proliferation von malignen B-Zellen zu untersuchen. Überraschenderweise entwickelten sich auch in Anwesenheit des HEL-Antigens keine BCR<sup>HEL</sup> positiven B-Zellen. Stattdessen entwickelte sich häufig eine T-Zell Leukämie. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei der T-Zell Leukämie der E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup> Maus um eine unreife, monoklonale T-Zell Neoplasie mit CD4/CD8 doppelt positivem Phänotyp handelt. Die Malignität konnte in adoptiven Tumor-Zelltransferversuchen nachgewiesen werden, in denen sich eine Migration und Expansion der T-Leukämiezellen in Milz, Lymphknoten und im Thymus nachweisen ließen. Weiterhin legte der Nachweis typischer Oberflächenmarker von Thymus-T-Zellen einen Ursprung der T-Leukämiezellen im Thymus nahe. Mittels PCR-Array Untersuchungen konnte eine Dysregulation des Notch-Signalweges festgestellt werden. Dies stellt einen wichtigen onkogenen Stimulus im Rahmen einer gestörten thymischen T-Zell Entwicklung dar. Als weiterer onkogener Stimulus konnte die Expression des transgenen humanen Tc11-Gens in allen T-Zellen der E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup> Maus nachgewiesen werden. In adoptiven Zelltransferversuchen konnte zudem eine Ko-Lokalisation der T-Leukämiezellen mit dendritischen Zellen an der T:B Zonen Grenze von SLOs demonstriert werden.

Der Immunphänotyp der E $\mu$ Tcl/BCR<sup>HEL</sup> Maus sowie der Krankheitsverlauf und die beteiligten Onkogene zeigen deutliche Parallelen zur humanen T-ALL. Zudem lässt die nachgewiesene Kolokalisation mit dendritischen Zellen in sekundär lymphatischen Organen eine wachstumsfördernde Interaktion mit der Mikroumgebung vermuten. Die T-ALL Zellen der E $\mu$ Tcl/BCR<sup>HEL</sup> Maus könnten für weitere Untersuchungen zur Aufklärung der onkogenetischen Mechanismen einer T-ALL, insbesondere der Rolle von Notch, verwendet werden. Zudem könnten sie zur weiteren Untersuchung der reziproken Interaktion von Tumorzellen mit Stromazellen genutzt werden.

## Abstract

Despite great advances in the therapy of lymphatic neoplasms, these diseases still remain incurable. Because of their rarity T-cell neoplasms represent a particular challenge. The deregulation of proliferative signals is a main driver in the malignant transformation of T-cells. In addition, the interaction between malignant T-cells and their microenvironment plays a role in oncogenesis. The aim of this project was to advance the understanding of these mechanisms by characterizing a spontaneously occurring T-cell leukemia in the transgenic E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup> leukemia mouse model.

The double-transgenic E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup> mouse strain was generated to analyze antigen-dependent activation and proliferation of malignant B-cells. However, with or without HEL-antigen stimulation, E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup> mice did not develop BCR<sup>HEL</sup>-positive B-cell leukemia. Instead, an enhanced frequency of T-cell leukemia development was observed. Further analysis revealed the immature CD4/8 positive phenotype of this monoclonal T-cell leukemia. The malignancy of this T-cell leukemia was proved using adoptive tumor cell transfer experiments. These experiments showed the migration and expansion of malignant T-cells in the spleen, lymph nodes and thymus. Leukemic T-cells were positive for several characteristic surface markers of thymic T-cells, pointing towards an origin of these cells in the thymus. PCR-Array experiments showed a deregulation of the notch-pathway. This constitutes a major oncogenic stimulus during the course of thymic T-cell development. As a second oncogenic stimulus transgene human-tcl1 was found expressed in all E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup> T-cells. Additionally, adoptive leukemia T-cell transfer showed the co-localization of leukemic T-cells with dendritic cells at the T:B cell zone border in secondary lymphatic organs.

Features such as the immunophenotype of the leukemia T-cells, the T-cell leukemia disease progression and the characterized oncogenic stimuli show similarities to human T-ALL. Furthermore, the colocalization of leukemic T-cells with dendritic cells may support their growth and survival. This T-cell leukemia mouse model might be useful to further investigate oncogenetic mechanisms in T-cell leukemia, especially the role of notch signaling. Moreover, this model could be used to investigate the reciprocal interaction between leukemic T-cells and their stromal microenvironment.





# 1. Einleitung

Das lymphatische System des Menschen, essentiell für die Abwehr von fremden Pathogenen, ist in seiner Funktion auf die tägliche Bildung von Millionen von Zellen angewiesen, welche überalterte Zellen ersetzen. Aufrechterhalten wird dieser Nachschub durch das beständige Teilen von Stammzellen und die Ausreifung ihrer Tochterzellen zu reifen Lymphozyten. Komplexe Kontrollmechanismen garantieren den regelhaften Ablauf dieser Teilungs- und Ausreifungsprozesse.

Das Entstehen von Leukämien und Lymphomen, malignen Entartungen des lymphatischen Systems, kann als ein Versagen dieser geregelten Entwicklung gesehen werden. Es kommt zu einer überschießenden und verdrängenden Teilung von Lymphozyten, welche lebensgefährliche Ausmaße annehmen kann. Laut der Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes waren bösartige Neubildungen des lymphatischen und blutbildenden Systems 2013 für 18.831 Todesfälle verantwortlich.<sup>1</sup> Besonders im Kindesalter spielen Leukämien und Lymphome eine große Rolle. Sie stellen mit einem Anteil von 44,3% die häufigste maligne Erkrankung des Kindes dar.<sup>2</sup> Zur Bekämpfung dieser Erkrankung ist ein Verständnis der Mechanismen, welche zur Entartung der lymphatischen Zellen führen, von entscheidender Bedeutung. Auf Grund der Seltenheit von T-Zell Lymphomen und Leukämien ist das Wissen über diese Erkrankungen im Vergleich zu B-Zell-Leukämien und Lymphomen weniger detailliert. Diese Arbeit soll durch die Charakterisierung einer murinen T-Zell-Leukämie einen Beitrag zur Aufklärung der Mechanismen liefern, die zur Entartung von T-Zellen führen.

## 1.1. Die T-Zellentwicklung

### 1.1.1. Vom Vorläufer zur reifen T-Zelle

Bevor man über die Entartung von T-Zellen spricht, muss man sich zunächst mit der physiologischen Entwicklung von T-Zellen auseinandersetzen. Die Entwicklung der T-Zellen von der Stammzelle zur reifen Effektorzelle läuft an drei unterschiedlichen Orten ab. Aus den Hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) des Knochenmarks bilden sich Multipotente Progenitorzellen (MPP), welche in den Thymus wandern (Abbildung 1).<sup>3</sup> Hier findet eine zunehmende Restriktion des Zellschicksals statt und die Differenzierung zu naiven CD4 oder CD8 einfach positiven (EP) T-Zellen.<sup>3,4</sup> Entscheidende Schritte in dieser Entwicklung sind die positive und negative Selektion von unreifen T-Zellen durch die antigenpräsentierenden Zellen des Thymus.<sup>5</sup> Die naiven CD4/CD8 EP T-Zellen verlassen dann den Thymus um in peripheren

## Einleitung

---

lymphatischen Organen durch den Kontakt mit Fremdanitigenen zu Effektor-T-Zellen zu reifen (Abbildung 1).

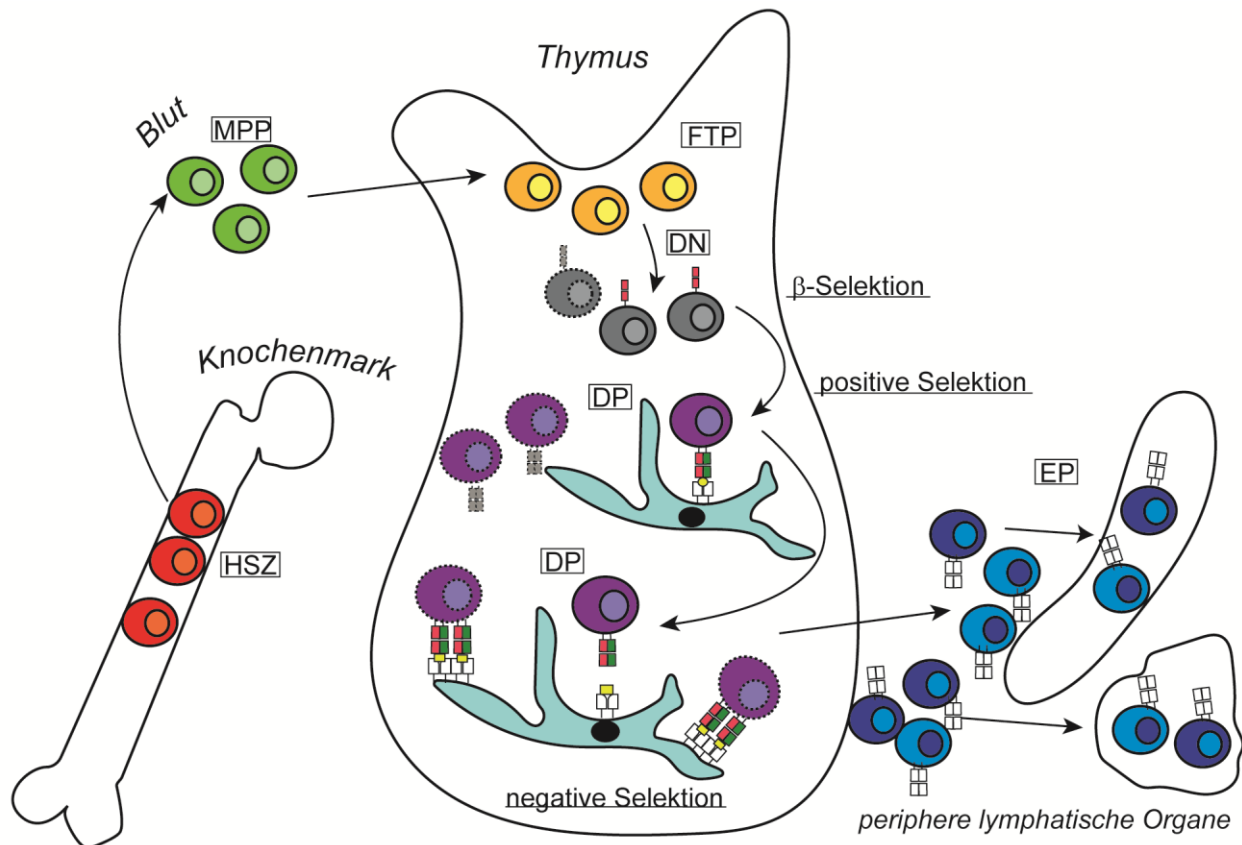
### 1.1.2. Wichtige Schritte in der thymischen T-Zellentwicklung

Im Thymus laufen entscheidende Schritte der T-Zellentwicklung ab. Der erste dieser Schritte ist die Restriktion des Zellschicksals der Progenitorzellen auf die T-Zellentwicklung. Während die MPPs noch die Fähigkeit zur Differenzierung in B-Zellen und Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) besitzen, schränkt sich das Differenzierungspotential nach dem Einwandern in den Thymus über die kortikomedulläre Verbindungszone weiter ein.<sup>6</sup> Über die Zwischenstufe der Frühen Thymischen Progenitorzellen (FTP) entwickeln sich die eingewanderten Zellen durch Kontakt mit thymischen Stromazellen zu unreifen CD4 und CD8 doppelt negativen T-Zellen (DN Zellen), welche erste charakteristische T-Zell Oberflächenmoleküle wie CD2 exprimieren.<sup>7</sup>

In der subkapsulären Zone des Thymus kommt es im nächsten wichtigen Entwicklungsschritt zur Ausbildung des T-Zell Rezeptors (TZR). Dessen Bildung beginnt mit dem Rearrangement der  $\beta$ -Kette des TZRs in DN Zellen.<sup>3,4</sup> Ein unproduktives Rearrangement der  $\beta$ -Kette führt zum Tod der DN Zellen. Diesen Prozess bezeichnet man als  $\beta$ -Selektion (Abbildung 1).<sup>8</sup> Nach erfolgreichem Rearrangement kommt es durch die Bindung einer prä-T-Zell Rezeptor  $\alpha$ -Kette an die  $\beta$ -Kette zur Bildung eines prä-TZRs. Zum Ende der DN Phase besitzen die T-Zellen einen unreifen TZR und exprimieren CD3.<sup>4,9</sup> Kommt es statt der Ausbildung eines  $\alpha\beta$ -prä-TZRs an diesem Punkt zur Expression eines  $\gamma\delta$ -TZRs endet die T-Zellentwicklung an diesem Punkt und die  $\gamma\delta$ -T-Zellen werden, ohne weitere Selektionsprozesse zu durchlaufen, in die Peripherie ausgeschleust.<sup>10,11</sup> Hier kolonialisieren sie vor allem die Haut und den Gastrointestinaltrakt.<sup>12,13</sup> Die im Thymus verbliebenen T-Zellen beginnen auf Grund von ligandenunabhängigen Signalen des prä-TZRs zu proliferieren und exprimieren CD4 und CD8 auf ihrer Oberfläche. Somit ist das doppelt positive (DP) Stadium der T-Zellentwicklung erreicht.<sup>4,9,14</sup>

Mit dem Rearrangement der  $\alpha$ -Kette beginnt die nächste Phase der T-Zellentwicklung. Im Kortex des Thymus exprimieren die DP T-Zellen nach einer Proliferationsphase und dem Rearrangement der  $\alpha$ -Kette einen spezifischen  $\alpha\beta$ -TZR. Essentiell für die spätere Funktion der T-Zellen ist das Erkennen von MHC-Peptid Komplexen. Dies wird durch den nun erfolgenden Prozess der positiven Selektion garantiert (Abbildung 1). DP T-Zellen welche einen TZR besitzen der MHC-Komplexe erkennt, werden durch die Interaktion mit Epithelzellen im Kortex des Thymus vor dem programmierten Zelltod bewahrt. Alle anderen DP T-Zellen gehen in Apoptose.<sup>15,16</sup>

Parallel zur Selektion der funktionsfähigen TZRs kommt es auch zum Übergang in das CD4 oder CD8 EP Stadium der T-Zellentwicklung. DP T-Zellen, die vor allem MHC II erkennen, werden unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors ThPOK zu CD4 EP T-Zellen.<sup>17</sup> DP T-Zellen welche vor allem MHC I erkennen, entwickeln sich unter der Kontrolle von Runx3 zu CD8 EP T-Zellen.<sup>18,19</sup>



**Abbildung 1 Die extra- und intrathymische T-Zellentwicklung** Ausgehend von den HSZ gelangen Vorläuferzellen in den Thymus und durchlaufen dort die wichtigen Schritte der  $\beta$ -Selektion sowie der positiven und negativen Selektion mit Hilfe der thymischen Stromazellen. Als reife EP T-Zellen verlassen sie den Thymus und migrieren zu peripheren lymphatischen Organen (nach Janeway's Immunobiology).<sup>5</sup> HSZ=Hämatopoetischen Stammzellen, MPP=multipotente Progenitorzellen, FTP=Frühe Thymische Progenitorzellen, DN=CD4/CD8 doppelt negative T-Zellen, DP=CD4/CD8 doppelt positive T-Zellen.

Der nächste Schritt in der Entwicklung der T-Zellen ist der Prozess der negativen Selektion, welcher in der Medulla des Thymus stattfindet (Abbildung 1). Hier werden die unreifen EP T-Zellen Selbstantigenen ausgesetzt, welche auf den thymischen Epithelzellen, dendritischen Zellen (DZs) und Makrophagen präsentiert werden.<sup>20</sup> Neben den Selbstantigenen auf den DZs und Makrophagen erlaubt es das Autoimmun Regulator Gen *aire* den thymischen Epithelzellen der Medulla auch gewebespezifische Antigene zu exprimieren, die normalerweise nicht im Thymus vorkommen.<sup>21</sup> Erkennt eine EP T-Zelle ein hier präsentiertes Selbstantigen hoch

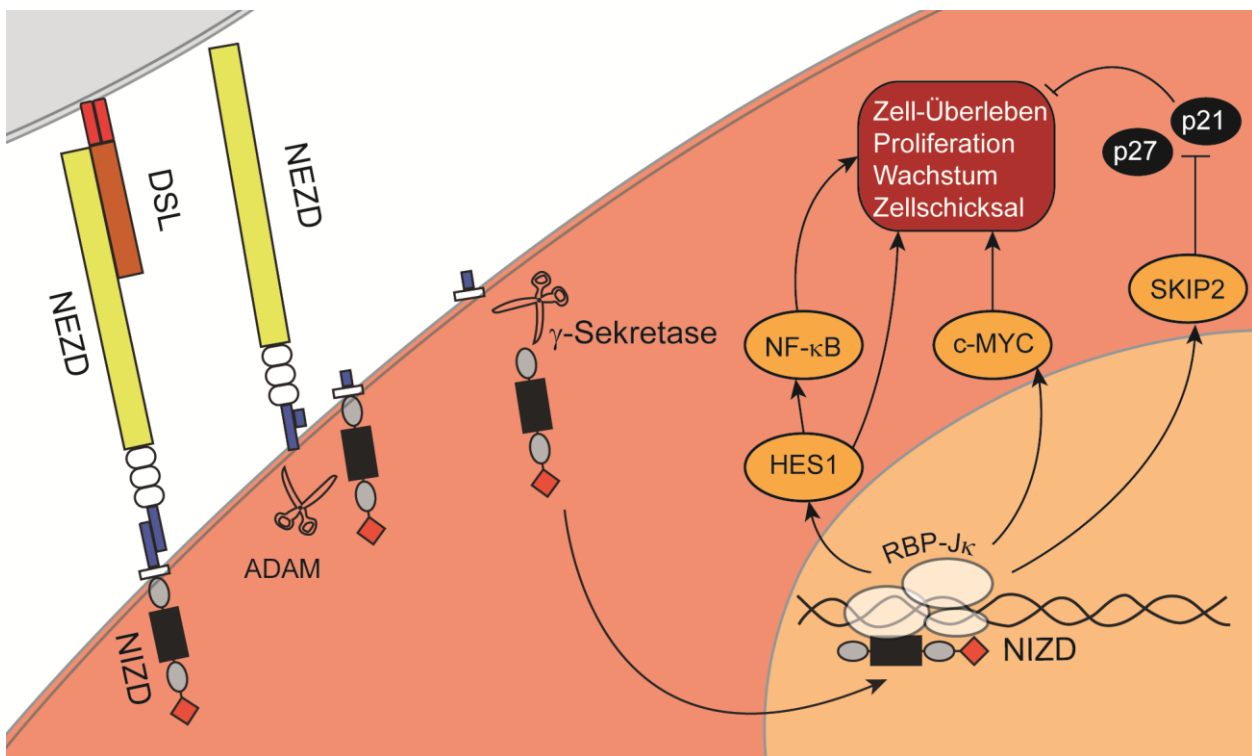
## Einleitung

spezifisch, so resultiert das im Tod dieser Zelle. So soll der Entwicklung von Autoimmunität vorgebeugt werden.<sup>20,22,23</sup>

Nach dieser letzten Stufe der Selektion ermöglicht das Sphingosin 1-phosphat 1 (S1P1) Rezeptor-Signal das Auswandern der naiven CD4 oder CD8 EP T-Zellen aus dem Thymus ins Blut und in die Lymphe.<sup>24,25</sup>

### 1.1.3. Der Notch Signalweg steuert die frühen Phasen der T-Zellentwicklung

Das regelhafte Durchlaufen aller Stufen der T-Zellentwicklung ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Der Notch Signalweg ist einer der zentralen Regulatoren der T-Zellentwicklung und entscheidend für die Bildung von CD4/CD8 EP T-Zellen. Eine Inhibition von NOTCH1 führt zum Abbruch der T-Zellentwicklung und zur Kolonisation des Thymus durch B-Zellen.<sup>26</sup> Der Notch Signalweg ist hoch konserviert und spielt in der gesamten Embryogenese eine bedeutende Rolle.<sup>27,28</sup>



**Abbildung 2 Der Notch Signalweg** Nach der Bindung von NOTCH1 an Liganden der DSL Familie kommt es zur Abspaltung der NIZD. Die Effekte der Notch Aktivierung werden über eine Reihe von Zielgenen vermittelt (s. 1.3.1) (modifiziert nach Radtke und Capaccione).<sup>4,29</sup> NIZD=intrazelluläre NOTCH1 Domäne, NEZD=extrazelluläre NOTCH1 Domäne, DSL=Delta/Serrate/LAG-2 Ligand, RBP-Jk=Recombining Binding Protein for Immunoglobulin J Region.

Haupteffektor des Signalwegs ist eine Familie von Transmembranrezeptoren (NOTCH1-4). Bei Bindung eines Liganden der Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) Familie an die extrazelluläre Domäne

von NOTCH1 (NEZD) kommt es zur Abspaltung der intrazellulären Domäne von NOTCH1 (NIZD) durch die Metalloprotease ADAM und die  $\gamma$ -Sekretase (Abbildung 2). NIZD wandert als Transkriptionsfaktor in den Zellkern und interagiert dort, über Bindung an den Recombining Binding Protein for Immunoglobulin J Region (RBP-J $\kappa$ ) Proteinkomplex, mit den Zielgenen des Notch Signalwegs (Abbildung 2).<sup>29-31</sup> In der T-Zellentwicklung ist der Notch Signalweg schon in den ersten Schritten essentiell, da er die Restriktion des Zellschicksals auf die T-Zellentwicklung und die Bildung von FTPs kontrolliert.<sup>32,33</sup> Des Weiteren ist die Ausbildung eines reifen TZRs nicht ohne NOTCH1 Signal möglich, da ohne dieses Signal der Prozess der  $\beta$ -Selektion nicht absolviert wird. Das Fehlen von NOTCH1, oder des durch NOTCH1 aktivierten Transkriptionsfaktors RBP-J $\kappa$ , führt zu einem fehlerhaften Rearrangement der  $\beta$ -Kette des TZR.<sup>34,35</sup>  $\gamma$ : $\delta$  T-Zellen sind in dieser Hinsicht besonders, da sie sich unabhängig von einem NOTCH1 Signal entwickeln können.<sup>36</sup> Nach der  $\beta$ -Selektion würde ein anhaltendes NOTCH1 Signal zu einem Abbruch der weiteren T-Zellentwicklung führen und wird deshalb inhibiert.<sup>37</sup>

### **1.1.4. *T-Cell Leukemia 1* (TCL1) ist ein wichtiger Faktor für das Überleben von DN und DP T-Zellen in der T-Zellentwicklung**

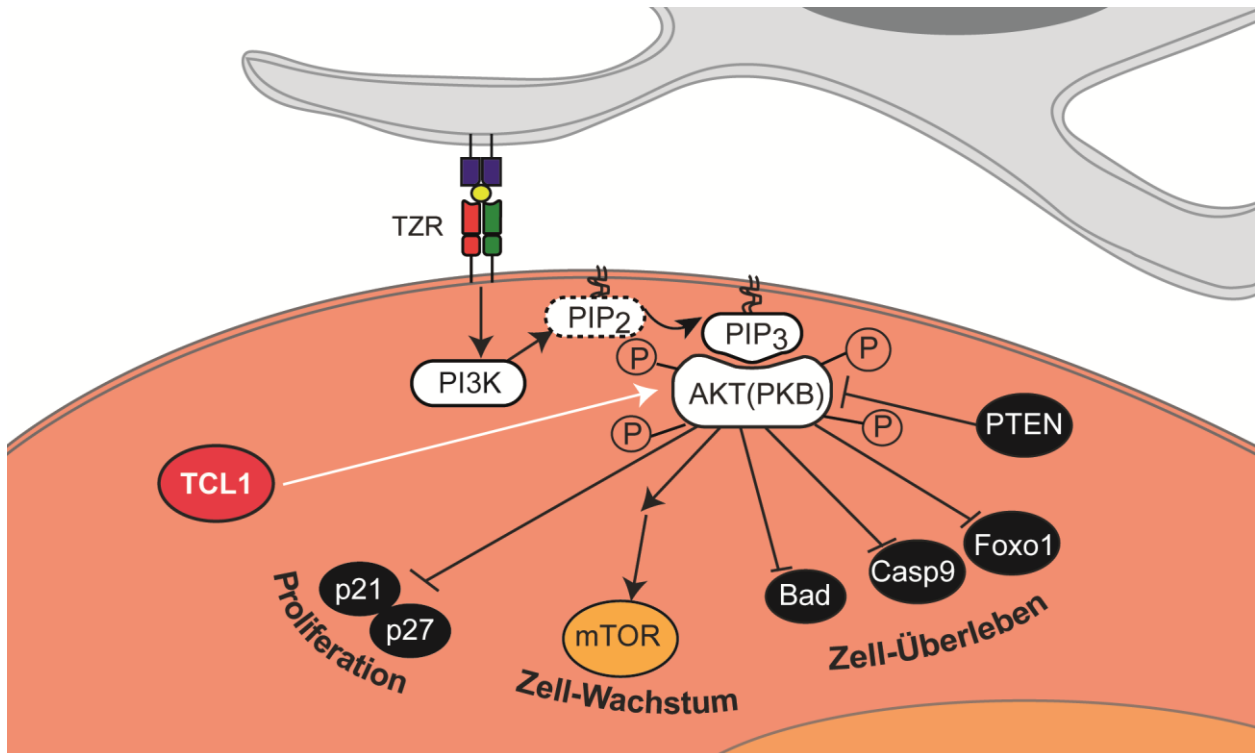
Ein weiterer wichtiger Faktor in der T-Zellentwicklung ist die TCL1-Genfamilie. TCL1 wird im Thymus von DN4 T-Zellen und DP T-Zellen sowie während der B-Zell Entwicklung im Knochenmark von unreifen B-Zellen exprimiert.<sup>38,39</sup>

Die Gene der TCL1-Familie kodieren für kleine, nicht-enzymatische Proteine, die ihre Wirkung hauptsächlich durch Bindung der RAC-Alpha Serine/Threonine-Protein Kinase (AKT1)/Proteinkinase B (PKB) entfalten. Die Bindung führt zu einer Stabilisierung und dadurch verstärkten Aktivität von AKT1.<sup>40,41</sup> Klassische Effekte des Akt Signalwegs sind die Vermittlung von Zell-Wachstum über Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), das Sichern des Zellüberlebens über die Hemmung proapoptotischer Proteine und die Stimulation des Zellzyklus über die Hemmung von p21 und p27 (Abbildung 3).<sup>42</sup> Ob die Aktivierung durch TCL1 in einer Steigerung aller durch AKT vermittelten Effekte mündet, ist jedoch noch unklar.

Ein Mangel von TCL1 führt zu einer starken Abnahme der DN und DP T-Zellen und resultiert in einer Schwächung der T-Zell abhängigen Immunantwort.<sup>38</sup> Der Akt Signalweg wird in reifen Zellen durch verschiedene Wachstumsfaktoren oder durch die Bindung von Antigen an den TZR stimuliert (Abbildung 3). Diese Stimulation entfällt in den unreifen DN und DP Stadien der T-Zellentwicklung. Die durch TCL1 gesicherte ligandenunabhängige Stimulation des Akt Signalwegs schützt womöglich die unreifen T-Zellen in dieser Phase der Entwicklung vor dem

## Einleitung

Zelluntergang.<sup>41,43</sup> Somit erklärt sich die Reduktion der DN und DP T-Zellen bei einem Fehlen von TCL1.



**Abbildung 3 TCL1 und der PI3K-Akt Signalweg** Der Akt Signalweg wird in T-Zellen durch die Bindung von Antigen-MHC Komplex an den TZR aktiviert. Die Transformation von PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub> bewirkt die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von AKT. Über die Phosphorylierung von Zielproteinen vermittelt AKT seine typischen Effekte. TCL1 ist ein wichtiger Faktor in der T-Zellentwicklung und wirkt über die Steigerung der Kinase Aktivität von AKT (modifiziert nach Manning).<sup>42</sup> TZR=T-Zell Rezeptor, PI3K=Phosphoinositid-3-Kinase, PIP<sub>2</sub>=Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP<sub>3</sub>=Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat, AKT=RAC-Alpha Serine/Threonine-Protein Kinase (AKT1)/ Proteinkinase B, TCL1=T-Cell Leukemia 1, Mammalian Target of Rapamycin (mTOR).

### 1.1.5. Das Chemokinsystem steuert die Migration von T-Zellen während ihrer Entwicklung und Reifung

Neben der Steuerung von Proliferation und Differenzierung bedarf es in der T-Zellentwicklung auch der Steuerung der Migration zwischen den einzelnen Organen, in denen T-Zellentwicklung und Reifung stattfindet. Dies wird durch Signalmoleküle der Chemokinfamilie ermöglicht, welche über die Bindung an G-Protein-gekoppelte Transmembranrezeptoren ihr Signal vermitteln.<sup>44</sup> So ist zum Beispiel die Einwanderung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark in den Thymus von Chemokinsignalen abhängig. Die Chemokine CCL19/CCL21 und ihr Rezeptor CCR7 sowie das Chemokin CCL25 und sein Rezeptor CCR9 garantieren die geregelte Migration der Vorläuferzellen in den Thymus und ermöglichen so die weitere

T-Zellentwicklung.<sup>45,46</sup> Nach dem Ende der T-Zellentwicklung im Thymus steuern Chemokine die Migration der EP T-Zellen in sekundäre lymphatische Organe (SLOs), wo die T-Zellen mit Fremdartigen in Kontakt treten. Der homöostatische Chemokinrezeptor CCR7 sowie das L-Selektin CD62L sind dabei essentiell für die Migration von T-Lymphozyten in die T-Zell-Zone von SLOs wie Milz und Lymphknoten. Zu einem geringeren Grad ist auch der homöostatische Chemokinrezeptor CXCR4 daran beteiligt.<sup>47,48</sup>

Neben ihrer Rolle in der Steuerung von Zellmigration spielen Chemokine auch eine Rolle in der T-Zell Differenzierung. So ist der CXCR4 Rezeptor mit seinem Liganden CXCL12 wichtig für das Passieren des  $\beta$ -Selektionspunktes und fungiert als Ko-Stimulator des prä-TZR.<sup>49</sup>

## 1.2. Humane T-Zell-Leukämien

Die beschriebenen Prozesse sind nur ein kleiner Teil der Mechanismen, die eine geregelte Funktion von T-Zellen garantieren. Eine Störung einer oder mehrerer dieser Mechanismen resultiert in der Entartung dieser T-Zellen und der Entstehung einer T-Zell-Leukämie oder eines Lymphoms. Die WHO Klassifikation von Tumoren des Hämatopoetischen und lymphatischen Systems (2008) ordnet 22 verschiedene T-Zell Neoplasien in Vorläuferneoplasien und in reife Tumore und benennt die einzelnen Unterformen.<sup>50</sup> Im Folgenden sollen einige dieser T-Zell Neoplasien beschrieben werden, deren Phänotyp und Entstehungsprozess relevant für die Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit sind.

### 1.2.1. Adulte T-Zell-Leukämie/Lymphom (ATLL)

Die ATLL ist eine virusassoziierte T-Zell Neoplasie, deren Vorkommen in Süd-Japan und in der Karibik an das hier endemische humane Retrovirus T-Zell-Leukämie Virus Typ 1 (HTLV-1) gekoppelt ist. Klinisch präsentiert sich die ATLL mit Leukozytose, Lymphadenopathie und Splenomegalie sowie mit extranodalem Befall, vor allem der Haut.<sup>50</sup> Obwohl die Infektion mit HTLV-1 wahrscheinlich schon im Kindesalter erfolgt, kommt es erst im mittleren Alter zum Ausbruch der Erkrankung. Das mediane Erkrankungsalter beträgt 58 Jahre. Die Inzidenz von ATLL unter den HTLV-1 infizierten beträgt 2,5%.<sup>50</sup> Kommt es einmal zum Ausbruch der Erkrankung ist die Prognose schlecht, das mediane Überleben beträgt dann weniger als 2 Jahre.<sup>51,52</sup> Die neoplastischen T-Zellen tragen Marker reifer T-Zellen wie CD2, CD3 sowie CD5 und sind in den meisten Fällen CD4 EP.<sup>52</sup> In seltenen Fällen wurde bei der ATLL auch ein CD4/CD8 DP Phänotyp der neoplastischen T-Zellen beschrieben.<sup>52,53</sup> Der DP Phänotyp ist mit einem aggressiven Krankheitsverlauf und einer schlechten Prognose assoziiert. Als Ursache für

## Einleitung

---

die Entstehung dieses Phänotyps wird unter anderem die Infektion unreifer DP T-Zellen durch HTLV-1 während der T-Zellentwicklung postuliert.<sup>53</sup>

### 1.2.2. T-Zell Prolymphozytische Leukämie (T-PLL)

Die T-PLL ist eine aggressive T-Zell Neoplasie, die sich klinisch mit Symptomen wie Splenomegalie, generalisierte Lymphadenopathie und Invasion der Haut bemerkbar macht und von post-thymischen, peripheren T-Zellen ausgeht. Bei der T-PLL handelt es sich um eine seltene Erkrankung, die nur etwa 2% der reifen lymphozytischen Leukämien ausmacht.<sup>50</sup> Dabei ist sie aber dennoch die häufigste reife T-Zell Neoplasie.<sup>54</sup> Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren wobei die Erkrankung etwas häufiger bei Männern auftritt.<sup>55</sup> Die Erkrankung verläuft sehr rasch, sodass das mediane Überleben meist unter einem Jahr liegt.<sup>50</sup>

Ein besonderes Merkmal der T-PLL ist der CD4/CD8 DP Phänotyp der entarteten T-Zellen, welcher in etwa einem Drittel der Fälle auftritt. Dies ist besonders ungewöhnlich, da reife post-thymische T-Zellen als Vorläuferzellen gelten. Dieser Phänotyp ist im Allgemeinen in reifen T-Zell Neoplasien sehr selten. Ein weiteres Merkmal der Erkrankung ist die relativ spezifische Überexpression von TCL1. Dieser Überexpression wird eine entscheidende Rolle in der Entstehung der T-PLL zugerechnet. Zudem ist sie mit einer schlechten Prognose assoziiert.<sup>50,54,55</sup>

### 1.2.3. Sézary Syndrom

Diese generalisierte, reife T-Zell Neoplasie ist eine leukämische Form des Kutanen T-Zell Lymphoms (L-CTCL) und macht etwa 5% der kutanen T-Zell Lymphome aus.<sup>50,56</sup> Die Erkrankung geht mit diffuser Erythrodermie sowie der Ausbreitung von neoplastischen T-Zellen im Blut und der Besiedlung von Lymphknoten einher.<sup>50,54,56</sup> Das Sézary Syndrom zeigt häufig multiple Resistenzen gegen gängige Therapeutika, das mediane Überleben liegt bei 3 Jahren.<sup>57</sup> Als Vorläuferzellen werden CD4 EP T-Zellen beschrieben.<sup>54,56</sup> Die leukämische Komponente des Sézary Syndroms ist in Abgrenzung zu rein kutanen Lymphomen wie Mycosis fungoides besonders. Als Ursache für dieses abweichende Verhalten der neoplastischen T-Zellen wird die Expression von CD62L und dem Chemokinrezeptor CCR7 verantwortlich gemacht. Diese Moleküle erlauben die Migration in lymphatische Organe und bedingen so die Manifestation außerhalb der Haut.<sup>56</sup>

### 1.2.4. T-Zell Akute Lymphoblastische Leukämie/Lymphom (T-ALL)

Bei der T-ALL handelt es sich um die einzige unreife T-Zell Neoplasie. Typische klinische Manifestationen sind Ausbreitung im Knochenmark, Leukozytose, mediastinale Raumforderung



sowie ZNS Infiltration. Die T-ALL macht 15% der kindlichen akuten Leukämien sowie 25% der adulten akuten Leukämien aus, wobei männliche Patienten überwiegen.<sup>50,58,59</sup> Die Erkrankung geht bei Kindern mit einer Überlebensrate von 70% und bei Erwachsenen mit einer Überlebensrate von etwa 50% einher und verläuft bei Kindern schwerer als die B-ALL.<sup>50,60</sup>

Die neoplastischen T-Zellen sind typischerweise CD4/CD8 DP, wobei die Expression weiterer Marker zwischen verschiedenen Unterformen variiert. Dies ist abhängig davon, in welcher Phase der T-Zellentwicklung eine Entartung stattgefunden hat.<sup>52,58</sup> Besonders unreife Formen der T-ALL zeigen noch Stammzellmarker wie CD34 oder Marker früher DN T-Zellen wie CD2. Die Positivität für CD1a kennzeichnet den kortikalen T-ALL Phänotyp und die Positivität für CD3 auf der Zelloberfläche den reifsten T-ALL Phänotyp.<sup>50</sup> Die reiferen T-ALL Formen werden auch als T-Zell Lymphoblastisches Lymphom (T-LBL) beschrieben, da diese selten leukämisch sind, sondern vor allem durch mediastinale Tumore sowie den Befall extranodaler Organe wie Haut, Leber und Testes charakterisiert sind.<sup>50,52,58</sup> Als Ursache für die Entstehung von T-ALL sind eine Reihe von Mechanismen beschrieben, wobei perinatale Charakterisierungsstudien nahe legen, dass der krankheitsauslösende Schaden erst nach der Geburt entsteht und mit einer Latenz von 2.5 Jahren zum Ausbruch der Erkrankung führt.<sup>61</sup> Einer der Mechanismen die zur Entstehung von T-ALL führen sind Translokationen wodurch Onkogene unter der Kontrolle von T-Zell spezifischen Verstärkern, wie zum Beispiel Genen der TZR-Familie, überexprimiert werden. Typische auf diese Weise involvierte Onkogene sind Mitglieder der Basic-Helix-Loop-Helix Familie von Transkriptionsfaktoren wie *tall2* oder *lyll*, LIM Only Domain Gene wie *lmo1* und *lmo2* oder weitere wohlbekannt Onkogene wie *myb* und *myc*.<sup>52,60</sup> Neben diesen vielen unterschiedlichen Translokationen gibt es eine Veränderung die wesentlich gleichmäßiger auftritt und zwar Mutationen des Notch Signalwegs. Im Rahmen von Translokationen ist NOTCH1 sehr selten involviert, nur in ca. 1% der T-ALL Fälle zeigen sich solche Aberrationen.<sup>59,60</sup> Mutationen, die zu einer Aktivierung von NOTCH1 führen, können jedoch in mehr als 50% der T-ALL Fälle nachgewiesen werden. Damit nimmt NOTCH1 eine zentrale Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung ein und ist deshalb zum Ziel von neuen experimentellen Behandlungsansätzen geworden.<sup>4,62,63</sup>

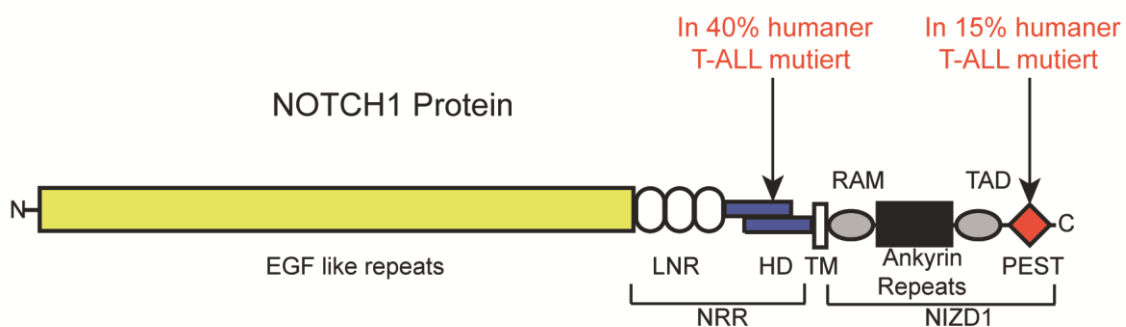
### 1.3. Mechanismen der Entartung von T-Zellen

#### 1.3.1. *notch1* als Onkogen in der Entwicklung von T-ALL

Die Expression von NOTCH1 ist essentiell für die frühe T-Zellentwicklung. Eine durch Translokationen oder Mutationen erhöhte und ligandenunabhängige Expression von NOTCH1

## Einleitung

ist jedoch mit der Entartung von T-Zellen zum Beispiel im Rahmen der T-ALL assoziiert. Einer der Mechanismen die zu erhöhter NOTCH1 Aktivität führen ist die chromosomale Translokation t(7;9)(q34;q34.3). Durch die Translokation von NOTCH1 in den  $\beta$ -TZR Locus kommt es zur ligandenunabhängigen Überexpression des translokations-assoziierten NOTCH1 Homologes TAN1.<sup>64</sup> Wesentlich häufiger sind allerdings Mutationen des Gens *notch1*. So kommen Mutationen der Heterodimerisations Domäne (HD) (Abbildung 3) in 40% der T-ALL Fälle vor. Durch diese Mutation wird die Verbindung zwischen dem intra- und extrazellulären Anteil von NOTCH1 gelockert, womit das eigentliche Signalmolekül NIZD leichter frei wird.<sup>4</sup> In 15% der T-ALL Fälle liegen Mutationen in der PEST Domäne vor (Abbildung 4). Dieser Abschnitt des NOTCH1 Proteins mit charakteristischer P-E-S-T Aminosäuresequenz sichert die regelhafte Degradation des Proteins. Eine Mutation verhindert die Degradation und führt zu verlängerter Halbwertszeit sowie vermehrter Stabilität von NOTCH1.<sup>4</sup> Mittels verschiedener Mausmodelle konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen der Mutationen des *notch1* Gens und der Entartung von T-Zellen gezeigt werden. So führt zum Beispiel die Expression des NOTCH1 Translokationsproduktes TAN1 aus humaner T-ALL in Mäusen zur Ausbildung einer hämatologischen Neoplasie, die der humanen T-ALL sehr ähnlich ist.<sup>65</sup>



**Abbildung 4 Das NOTCH1 Protein** Gezeigt ist das NOTCH1 Protein mit den in humaner T-ALL typischerweise von Mutationen betroffenen Bereichen. LNR=Lin-12/Notch Repeat; HD=Heterodimerisations Domäne; NRR=negative regulatorische Region; TM=Trans-Membran Domäne; RAM=RBP-Jkappa assoziiertes Modul; TAD=transaktivierende Domäne; PEST=Degron Domain mit spezifischer Aminosäuresequenz (P-E-S-T).

Typische Charakteristika von unreifen T-Zellen, wie Proliferation und Selbsterneuerung, werden als Folge von Mutationen des *notch1* Gens unkontrollierbar und somit zu Treibern der Entartung.<sup>66,67</sup> Die Ligandenunabhängigkeit der NOTCH1 Expression erlaubt es zudem diesen T-Zellen die ligandenreiche Umgebung des Thymus zu verlassen und sich im Blut und lymphatischen Organen zu verbreiten.<sup>29,66</sup> Der durch anhaltende NOTCH1 Aktivität ausgelöste

Abbruch der T-Zellentwicklung (s. 1.1.3) erklärt, warum Notch Mutationen vor allem in Fällen von unreifen T-Zell Neoplasien wie der T-ALL gefunden werden.

Vermittelt werden die Effekte der NOTCH1 Aktivität durch eine Reihe von Zielgenen, auf die NOTCH1 als Transkriptionsfaktor wirkt (Abbildung 2). So wird während der T-Zellentwicklung durch NOTCH1 das Proto-Onkogen *c-myc* aktiviert. Im Rahmen pathologisch erhöhter NOTCH1 Aktivität verstärken sich NOTCH1 und c-MYC durch überlappende Zielgene in ihrer Wirkung gegenseitig und vermitteln gemeinsam ein starkes leukämisches Zellwachstum.<sup>68</sup> Ein weiterer wichtiger Vermittler der NOTCH1 Aktivität ist der transkriptionale Repressor HES1, der in seiner physiologischen Funktion essentiell für die Festlegung des Zellschicksals während der T-Zellentwicklung ist. Ebenso bedeutsam ist HES1 jedoch auch in der Entstehung und Erhaltung NOTCH1-abhängiger T-ALL.<sup>69</sup> Erhöhte NOTCH1 Aktivität ist zudem mit der erhöhten Aktivität von NF- $\kappa$ B assoziiert, wahrscheinlich vermittelt durch HES1, was das Überleben der T-Leukämiezellen unterstützt.<sup>70,71</sup> Des Weiteren ist von der erhöhten NOTCH1 Aktivität auch die Zellzyklusregulation betroffen. Durch die Induktion der Transkription des F-Box Proteins SKIP2 kommt es zur vermehrten Degradation der Zellzyklusinhibitoren p27<sup>Kip1</sup> und p21<sup>Cip1</sup>. Der Wegfall dieser Inhibition trägt zur beschleunigten Entstehung von T-ALL bei.<sup>72,73</sup>

Zusammengenommen machen diese Effekte *notch1* zu einem potenten Onkogen in der Entstehung von T-Zell Neoplasien. Zudem wird am Beispiel der Notch Mutationen sehr gut deutlich, wie nah die Mechanismen der physiologischen T-Zellentwicklung und die pathologische Leukämie Entwicklung beieinander liegen. Die von NOTCH1 vermittelten Effekte wie die Anregung der Proliferation und das Erhalten von Krebs-Stammzellen sind dabei nicht auf Tumore des lymphatischen Systems begrenzt. So werden Fehlregulationen des Notch Signalwegs zum Beispiel auch in Lungen- und Brustkrebs gefunden.<sup>29</sup>

### **1.3.2. TCL1 und der PI3K-Akt Signalweg in der Entstehung von T-Zell Neoplasien**

Der PI3K-Akt Signalweg und seine Stimulation durch TCL1 tragen entscheidend zur Aufrechterhaltung der Proliferation von unreifen T-Zellen im Rahmen der thymischen T-Zellentwicklung bei. Jedoch ist TCL1 ähnlich wie NOTCH1 auch mit einer Reihe von Neoplasien assoziiert. Erstmals beschrieben wurde TCL1 auf Grund seiner Beteiligung an einer häufigen Translokation in humanen T-Zell-Leukämien.<sup>74</sup> Erkrankungen, die häufig eine Assoziation mit erhöhter TCL1-Expression zeigen, sind die T-PLL und die Chronisch Lymphozytische T-Zell-Leukämie (T-CLL) im Rahmen von Ataxia telangiectasia.<sup>75</sup> In Patienten mit T-PLL kann die erhöhte TCL1-Expression vor allem auf strukturelle

Chromosomenaberrationen zurückgeführt werden. 80% der Patienten zeigen eine Inversion auf Chromosom 14 zwischen q11 und q32 und 10% zeigen die Translokation t(14;14)(q11;q32). Beide Aberrationen resultieren in der erhöhten Expression von TCL1.<sup>50</sup> Ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Überexpression von TCL1 und der Entstehung von T-Zell Neoplasien ließ sich bereits durch die schlechte Prognose TCL1-positiver Leukämie Patienten vermuten. Durch die kontrollierte Überexpression von TCL1 im Mausexperiment konnte dieser Zusammenhang bewiesen werden.<sup>75</sup> Analog zur onkogenen Wirkung von NOTCH1 beruht die onkogene Wirkung von TCL1 auf der Überhöhung der im Rahmen der physiologischen T-Zellentwicklung induzierten Effekte. So ist in der pathologischen Wirkung von TCL1 die Kinase AKT der wichtigste Effektor des TCL1 Signals. Die Überexpression von TCL1 führt über AKT zu einer Steigerung der Zellteilung und zu einer Verbesserung des Zellüberlebens.<sup>39</sup> Vermutlich werden diese pathologischen Effekte über die typischen Mechanismen des Akt Signalwegs vermittelt (Abbildung 3).

Die Überaktivierung des Akt Signalwegs kann auch unabhängig von TCL1 zur Entartung von T-Zellen führen. So zeigen bis zu 50% der Patienten mit T-ALL aktivierende Mutationen von PI3K oder AKT beziehungsweise hemmende Mutationen des AKT-Inhibitors PTEN.<sup>76</sup> Diese Veränderungen, vor allem die PTEN Mutationen, sind therapeutisch bedeutsam, da sie mit Chemotherapieresistenz einhergehen.<sup>76</sup> Ebenso kann die erhöhte Expression von TCL1 unabhängig von der AKT-Aktivierung zur Entartung von Lymphozyten führen. Für die Chronisch Lymphozytische B-Zell-Leukämie konnte gezeigt werden, dass TCL1 über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die Hemmung des proapoptotischen Faktors AP-1 zur Entartung der B-Zellen beiträgt.<sup>77</sup> Den onkogenen Effekt von TCL1 in B-Zellen hat man sich in der Generierung von B-CLL Mausmodellen zu Nutze gemacht. Die B-Zell spezifische Expression von TCL1 unter dem Promoter E $\mu$  führt zu einer murinen Leukämie, welche der humanen B-CLL sehr ähnlich ist.<sup>78</sup>

Auch wenn die Mechanismen, welche den onkogenen Effekt von TCL1 vermitteln noch nicht im Detail geklärt sind, so macht besonders die Verwendung in Mausmodellen das onkogene Potential von TCL1 deutlich.

### 1.3.3. Die Rolle der Mikroumgebung in der Entstehung von T-Zell Neoplasien

Neben zellinternen Mediatoren, spielt bei hämatologischen Tumoren auch die Umgebung der malignen Zellen eine entscheidende Rolle im Prozess der malignen Transformation. Die Stimulation durch Zellen ihrer Mikroumgebung unterstützt maligne Lymphozyten sowohl im Prozess der Entartung als auch in der Aufrechterhaltung von Wachstum und Proliferation.

Zudem können durch die zelluläre Umgebung Resistenzen gegen Chemotherapie vermittelt werden.<sup>79,80</sup> Besonders bedeutend sind dabei jene Orte, an denen im Rahmen der physiologischen Entwicklung Lymphozytenvorläufer und reife Lymphozyten zu Wachstum und Proliferation angeregt werden. So spielt die Interaktion von HSZ mit Osteoblasten im Knochenmark eine wichtige Rolle in der Entstehung von Leukämien.<sup>79</sup> Des Weiteren ist die Interaktion von Lymphozyten mit mesenchymalen Stromazellen und lymphomassoziierten Makrophagen der SLOs bedeutend für die Entwicklung von Lymphomen.<sup>80</sup> Für die T-ALL konnte gezeigt werden, dass besonders die Interaktion mit der Mikroumgebung der Milz wichtig für die Entstehung und Erhaltung von Malignität ist. Im Mausmodell zeigte sich bei Transfer von T-ALL Zellen in immunkompetente Empfängermäuse eine starke Migration maligner T-Zellen in die Milz.<sup>81</sup> T-ALL Zellen konnten in der Milz zu einem früheren Zeitpunkt und in größeren Zahlen detektiert werden als zum Beispiel im Knochenmark. Dabei konnte gezeigt werden, dass Chemokinsignale die bevorzugte Besiedlung der Milz durch T-ALL Zellen bedingen. Auf Grund ihrer Positivität für CCR7 führte der hohe CCL19 Spiegel in der Milz zur verstärkten Einwanderung von T-ALL Zellen. Die Ko-Kultivierung mit Splenozyten verstärkte die Malignität von T-ALL Zellen und die Entfernung der Milz aus Mäusen mit T-ALL konnte ihr Überleben verlängern.<sup>81</sup> Die Bedeutung der Mikroumgebung für T-ALL Zellen wird auch an einem anderen Beispiel deutlich. In einem T-ALL Mausmodell, welches das An- und Abschalten der Expression des AKT-Inhibitors PTEN erlaubt, konnte durch die Aktivierung von PTEN eine Reduktion des T-ALL Befalls von Darm und Leber erzielt werden. In Milz und Lymphknoten jedoch, war die T-ALL Population unverändert. Dies macht das Potential der Mikroumgebung von SLOs deutlich, das Überleben von T-ALL Zellen zu sichern.<sup>82</sup>

### 1.4. Fragestellung

Trotz vieler Erkenntnisse zum Krankheitsverlauf und Entstehungsprozess von T-Zell-Leukämien sind diese im Vergleich zu anderen malignen Erkrankungen auf Grund der Seltenheit der T-Zell-Leukämien noch relativ unvollständig untersucht. Die T-Zell-Leukämien bleiben damit, trotz ihres vergleichsweise seltenen Auftretens, besonders im Kindesalter lebensbedrohliche Erkrankungen mit schlechten Heilungschancen.

In dieser Arbeit soll durch die Charakterisierung eines neuen Mausmodells einer T-Zell-Leukämie ein Beitrag zum mechanistischen Verständnis der T-Zell-Leukämien geleistet werden. Möglicherweise ergeben sich durch ein besseres Verständnis des Entartungsprozesses neue Therapiemöglichkeiten, welche zur Besserung der Heilungschancen von Patienten mit T-Zelleukämien beitragen. Die Charakterisierung soll auf mehreren Ebenen stattfinden. Als erstes soll die Malignität der T-Leukämiezellen nachgewiesen werden und das Disseminationsmuster der T-Leukämiezellen in lymphatische und periphere Organe untersucht werden. Zusätzlich soll die Identität der T-Leukämiezellen mittels Durchflusszytometrie und qPCR Analyse näher bestimmt werden. Anschließend sollen grundlegendere Fragen wie der Ursprung der T-Leukämiezellen und die Mechanismen ihrer malignen Transformation geklärt werden. Dafür sollen vergleichende qPCR Analysen sowie adoptive Transferversuche und Mutationsanalysen eingesetzt werden. Ergebnis dieser umfassenden Charakterisierung soll die Aufdeckung neuer Mechanismen der T-Zell Entartung sein. Abschließend ist die Ähnlichkeit der murinen T-Leukämie mit humanen Leukämien zu diskutieren, da dies die Übertragung der hier gewonnen Erkenntnisse auf den Menschen ermöglichen würde.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Becton Dickinson: 7-AAD, Kollagen IV

Biotez: Primer **Del1F** ATG GTG GAA TGC CTA CTT TGT A; Primer **Del1R** CGT TTG GGT AGA AGA GAT GCT TTA C; Primer **Del2F** TTG CTC TGC CTA ACG CTG CT; Primer **Del2R** AGG GAG AAC TAC TGG CTC CTC AAA

Calbiochem: Mowiol-488

Fluka: Saponin

Fermentas: MgCl 25mM

Invitrogen: dNTPs 10mM

Lonza: SeaKem Aggarose

Merck: Kaliumhydrogencarbonat, Wasserstoffperoxid, Kaisers Glyceringelatine

PAA: HEPES, Penicillin/Streptomycin 100x, RPMI 1640 mit L-Glutamin, Serum (Ratte, Maus, Hamster, Ziege, normales Kälberserum)

C. Roth: Aceton, Ammoniumchlorid, Bovines Serumalbumin FraktionV, Dimethylformamid, Dinatriumhydrogenphosphat, EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat, Ethanol, Glycerin, Histofix (4 %-ige säurefreie, phosphatgepufferte Formaldehydlösung), Natriumdihydrogenphosphat, 2-Propanol, Toluol, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Tween 20, Xylol, Ethidiumbromid 1%

SAFC: L-Lysin

Sigma-Aldrich: DABCO, DMSO, Fast Blue BB Salt, Glass Beads, Natriumperiodat, Paraformaldehyd, Succrose, Trypanblau-Lösung (0.4%),

#### 2.1.2. Puffer

Auftaumedium: RPMI mit 10% FKS und 1% Pennicillin/Streptomycin

Citratpuffer pH6: **Lsg1** 10.5g Citronensäure-Monohydrat auf 500ml H<sub>2</sub>O; **Lsg2** 29.53g Tri-Na-citrat-Dihydrat auf 1L H<sub>2</sub>O; Für Gebrauch 27ml Lsg1 + 123ml Lsg2 +1350ml H<sub>2</sub>O

Erythrozyten-Lyse-Puffer 10x: 1,67M NH<sub>4</sub>CL, 100mM KHCO<sub>3</sub>, 1mM EDTA

FACS-Puffer: 1xPBS, 2% FKS, EDTA 0.5M ph8.0

Fixationspuffer: Phosphatpuffer mit 10mg PFA/ml, 2mg/ml NaIO<sub>4</sub> und 0.1M L-Lysin

PBS: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM

Phosphatpuffer: 0.05M NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4

## Material & Methoden

Tris-Puffer pH 7.6: 0.1mM Trisma Base

TNT-Waschpuffer: 60.55g Trisma Base, 87.66g NaCl auf 1L H<sub>2</sub>O, pH auf 7.6 einstellen und 500µl Tween 20 hinzufügen

TAE-Puffer: 242g Trisma Base, 51.1ml Essigsäure, 10ml EDTA (pH8, 0.5M) zu 1L H<sub>2</sub>O

Zell-Lyse-Puffer: 100mM NaCl, 10mM TrisHCl pH8, 25mM EDTA pH8, 0.5% SDS, 0.1mg/ml Proteinase K kurz vor Gebrauch hinzufügen

### 2.1.3. Antikörper und Streptavidin-Konjugate

**Tabelle 1:** Primärantikörper für Durchflusszytometrie

| Zielantigen | Spezies     | Farbstoff         | Verdünnung     | Hersteller/<br>Klon                 |
|-------------|-------------|-------------------|----------------|-------------------------------------|
| CD-3        | Hamster IgG | PE,APC<br>PB,FITC | 1:400<br>1:200 | BioLegend<br>145-2C11               |
| CD-4        | Ratte IgG2b | PE<br>PerCP       | 1:400<br>1:200 | BioLegend<br>GK1.5                  |
| CD-5        | Ratte IgG2a | APC, PE           | 1:400          | eBioscience,<br>Biolegend<br>53-7.3 |
| CD-8        | Ratte IgG2a | APC<br>FITC, PB   | 1:400<br>1:200 | BioLegend<br>5.3-6.7                |
| CD-19       | Ratte IgG2a | PB, PerCP         | 1:200          | BioLegend<br>6D5                    |
| CD-24       | Ratte IgG2b | Biotinyliert      | 1:100          | BioLegend<br>M1/69                  |
| CD-25       | Ratte IgG1  | FITC<br>PE        | 1:200<br>1:400 | BioLegend<br>PC61                   |
| CD-27       | Hamster IgG | APC               | 1:400          | Biolegend<br>LG.3A10                |
| CD-44       | Ratte IgG2b | PE                | 1:400          | BioLegend<br>IM7                    |
| B220 (CD45) | Ratte IgG2a | FITC, PB          | 1:200          | BioLegend<br>RA3-6B2                |
| CD-45.2     | Maus IgG2a  | PB                | 1:200          | BioLegend<br>104                    |
| CD-62L      | Ratte IgG2a | FITC              | 1:200          | BioLegend<br>MEL-14                 |
| CD-69       | Hamster IgG | FITC              | 1:200          | BioLegend<br>H1.2-F3                |
| CD-117      | Ratte IgG2b | PE                | 1:400          | BD<br>SB/199                        |
| CD-127      | Ratte-IgG2b | FITC              | 1:200          | BioLegend 2B8                       |
| CXCR 4      | Ratte IgG2b | FITC              | 1:100          | BD<br>2B11/CXCR4                    |



|                   |             |              |  |  |
|-------------------|-------------|--------------|--|--|
| <b>CXCR 5</b>     | Ratte IgG2a | PE           | 1:100  | BD<br>2G8                                |
| <b>CCR 6</b>      | Ratte IgG2a | PE           | 10µl/1x10 <sup>6</sup> Zellen                                  | R&D<br>140706                            |
| <b>CCR 7</b>      | Ratte IgG2a | biotinyliert | 1:50   | BioLegend<br>4B12                        |
| <b>CCR 9</b>      | Hamster IgG | FITC         | 1:100  | BioLegend<br>9B1                         |
| <b>CCR 10</b>     | Ratte IgG2b | APC          | 10µl/1x10 <sup>5</sup> Zellen<br>10µl/1x10 <sup>6</sup> Zellen | LifeSpan<br>BioScience/<br>R&D<br>248918 |
| <b>TCL1 human</b> | Maus IgG1   | Biotinyliert | 1:300  | MBL<br>27D6/20                           |

**Tabelle 2:** Primärantikörper für Immunhistologie

| Zielantigen               | Spezies       | Farbstoff                          | Verdünnung    | Hersteller              |
|---------------------------|---------------|------------------------------------|---------------|-------------------------|
| <b>CD-3</b>               | Hamster IgG   | AF-488, PB                         | 1:100         | BioLegend<br>145-2C11   |
| <b>CD-11c</b>             | Hamster IgG   | AF-488, AF-647, PB                 | 1:100         | BioLegend<br>N418       |
| <b>B220 (CD45)</b>        | Ratte IgG2a   | PB, AF-488, BV-421<br>biotinyliert | 1:100         | BioLegend<br>RA3-6B2    |
| <b>CD-45.2</b>            | Maus IgG2a    | Biotinyliert<br>AF-488             | 1:50<br>1.100 | BioLegend<br>104        |
| <b>gp38</b>               | Hamster IgG   | Ungekoppelt                        | 1:100         | eBioscience<br>eBio8.11 |
| <b>TCL1 human</b>         | Maus IgG2b    | AF-647                             | 1:200         | BioLegend<br>1-21       |
| <b>Ki-67</b>              | Ratte IgG2a   | Ungekoppelt                        | 1:100         | Dako<br>Tec3            |
| <b>Gespaltenes NOTCH1</b> | Kaninchen IgG | Ungekoppelt                        | 1:100         | Cell Signaling<br>D3B8  |

**Tabelle 3:** Isotypkontrollen

| Spezies     | Farbstoff                               | Verdünnung                   | Hersteller | Klon     |
|-------------|---|------------------------------|------------|----------|
| Ratte IgG1  | PE, FITC                                | Entspricht der<br>Verdünnung | BioLegend  | RTK2071  |
| Ratte IgG2a | Biotinyliert,<br>FITC, PerCP<br>APC, PE | des Antikörpers              | BioLegend  | RTK2758  |
| Ratte IgG2b | Biotinyliert,<br>FITC, PE, APC          |                              | BioLegend  | RTK4530  |
| Maus IgG1   | biotinyliert                            |                              | BioLegend  | MOPC-21  |
| Maus IgG2a  | APC                                     |                              | BioLegend  | MOPC-173 |

## Material & Methoden

|                 |                        |  |            |          |
|-----------------|------------------------|--|------------|----------|
| Hamster IgG     | PE, FITC, APC<br>PerCP |  | BioLegend  | HTK888   |
| Normal goat IgG | ungekoppelt            |  | Santa Cruz | Sc- 2028 |

**Tabelle 4:** Sekundärantikörper

| Reaktivität | Spezies | Farbstoff/Enzym | Verdünnung | Hersteller     |
|-------------|---------|-----------------|------------|----------------|
| Hamster     | Ziege   | AF568           | 1:200      | BioLegend      |
| Kaninchen   | Ziege   | biotinyliert    | 1:100      | Jackson Immuno |
| Ratte       | Ziege   | Biotinyliert    | 1:100      | Jackson Immuno |

### Streptavidin-Konjugate

- SA-PE; Verdünnung 1:300; BioLegend
- SA-PerCP; Verdünnung 1:300; BioLegend
- SA-AF568; Verdünnung 1:200; invitrogen
- SA-Peroxidase; Verdünnung 1:200; Jackson Immuno

### **2.1.4. Rekombinante Proteine**

Finnzymes: Phusion Hot Start Polymerase

New England Biolabs: LongAmp Taq-Polymerase

PeptoTech: SDF1, CCL21

### **2.1.5. Kits**

Agilent: RNA 6000 Nano Kit

Becton-Dickinson: TCR Vb Screening Panel

Dako Cytomation: AEC Substrate Chromogen, Biotin Blocking Solution, REAL Haematoxilin

Invitrogen: LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit; FIX & PERM® Cell Fixation & Cell Permeabilization Kit, Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR

Qiagen: RNeasy Mini Kit, DNase, RT<sup>2</sup> First Strand Kit, RT<sup>2</sup> SYBR Green Fluor Mastermix, RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array: Mouse T-Helper Cell Differentiation (PAMM-503Z), Mouse PI3K-Akt Signaling Pathway (PAMM-058ZA), Mouse Notch Signaling Pathway (PAMM-059ZA)

Thermo Scientific: GeneRuler 1kb DNA Ladder, Phusion HF Polymerase + 5x HF Buffer

### **2.1.6. Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Agilent: Bioanalyzer 2100

BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH: Reinluftbank für die Zellkultur

Becton-Dickinson: Durchflusszytometer (BD FACS-Canto II), BD FACS Flow, 5 ml Polystyrol-Rundboden-Röhrchen, 100µm Zellfilter, Zell-Sorter BD FACSAria I-III

Beem: Omni Perfect Dampfkochtopf

Biorad: iCycler IQ5

Costar: transwell permeable supports (5µm), 50ml Reagenzienreservoir

Eppendorf: Combitips, 1.5ml, 2ml Reagenzgefäße, Heizblock, Mastercycler pro S

Gilson: Pipetman Pipetten 1000µl, 200µl, 20µl, 2µl

Greiner bio one: Zellkulturschalen, 15ml und 50 ml Röhrchen, Plastikpasteurpipetten

Hybaid: Elektrophorese Kammern

Innovatis: CASY® cell counter TTC, CASY ton

Integra biosciences: Pipetboy acu

IKA: MS3 Vortexer

LO-Laboroptik GmbH: Neubauer-Zählkammer (0,1 mm Tiefe)

Leica: Mikroskop DM IL und DM LS2

McCormick scientific: Einbettkassetten, Paraplast zur Paraffineinbettung

Mettler-Toledo: Analytische Feinwaage, pH-Meter

Microm International: HM560 Kryostat, HM355s Microtom, EC350-1/-2 Paraffineinbettstation, HMS740 Färbeautomat, CTM6 Eindeckelautomat

MJ Research: PTC-200 Peltier Thermal Cycler

Nunc: 96-well Mikrotiterplatte

PeqLab: NanoDrop 1000

Pharmacia Biotech: EPS 600 Electrophoresis Power Supply

Rainin: Pipet-Lite 1000µl, 200µl, 20µl, 2µl, Mehrkanalpipetten 200µl, 20µl

Richard-Allan Scientific: Cytoseal XYL

C. Roth: Deckgläser, Glaspasteurpipetten

Sakura: Tissue-Tek®, Cryomold Einbettförmchen

Sarstedt: Cryotubes Einfriergefäße

Schneider: Chirurgische Instrumente

Schott: Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Glasflaschen, sonstige Glasgeräte

Starlab: RepeatOne® Dispenser, 0,2ml 12-Strip-PCR Reaktionsgefäße

Syngene: GeneGenius Bio Imaging System

Thermo-Scientific: Nalgene® Mr. Frosty freezing container, IEC MicroMax Tischzentrifuge, Menzel-Gläser SuperFrost plus, Heraeus Multifuge 4KR, Inkubator

Carl Zeiss: Axiovision Z2 Mikroskop, ApoTome.2, AxioCam MRm/MRc5, HXP120c

### 2.1.7. Software

Adobe: Illustrator CS3, Photoshop CS3

Agilent: 2100 Expert Software

Becton Dickinson: FACS Diva

BioRad: IQ5 Optical System Software

FlowJo: FlowJo Version 9.4.10

Graphpad Software, Inc.: Prism 4.0c

SABioscience: RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis Version 3.5

Syngene: Gene Snap

Zeiss: Axio Vision Release 4.8.2

## 2.2. Zellbiologische Methoden

### 2.2.1. Isolierung von Lymphozyten

Die Isolierung beginnt mit der Präparation der zu untersuchenden Maus. Die Milz, inguinale und mesenteriale Lymphknoten sowie der Thymus wurden entnommen und in einer Zellkulturschale mit FACS-Puffer zerstampft. Die so entstandene Zellsuspension wurde nun zuerst filtriert (50µm Filter) und zentrifugiert (8min bei 1200rpm). Bis zu 1ml Blut wurde aus dem Herzen der Maus mit einer 25G Kanüle entnommen und in 50µl Heparin übertragen. Bei den Milz- und Blutproben schloss sich eine Erythrozytenlyse an (5ml hypotoner Lysepuffer für 5min). Nach dem Abstoppen der Lyse mit 10ml FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation, konnten die Zellen für Experimente verwendet werden. Für die Gewinnung von Zellen aus dem Knochenmark wurden zuerst die Oberschenkelknochen aus den Hinterläufen freipräpariert. Anschließend wurde das Mark dann mit 10ml RPMI + 10%FKS aus dem Knochen gespült. Nach einem Wasch- und Filterschritt konnten diese Zellen analysiert werden.

### 2.2.2. Zählen der Zellen

Mit dem CASY® cell counter: 5µl Zellsuspension wurden in 10ml CASYton (1:2000) gelöst und am Gerät ausgezählt.

Mit der Neubauerzählkammer: Zuerst wurde die Zellsuspension verdünnt, z.B. 5µl in 45µl Medium (1:10). Anschließend wurden 15µl mit 15µl Trypan-Blau vermengt und in der Kammer ausgezählt. Zellzahl/ml= gezählte Zellen x 10000 x 2 x Verdünnung

### 2.2.3. Zellen einfrieren und auftauen

Zur Langzeitkonservierung wurden je ca.  $1 \times 10^8$  Zellen in Einfriermedium (1ml pures FKS mit 10%DMSO) überführt und in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert. Bei Bedarf wurden die Zellen in einem Wasserbad (37°C) aufgetaut, in 5ml Auftaumedium aufgenommen und zentrifugiert.

### 2.2.4. Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein analytisches Verfahren, das der Unterscheidung und Quantifizierung verschiedener Zellpopulationen dient. Dies gelingt mit Hilfe von Antikörpern, welche populationsspezifische Antigene erkennen. An die Antikörper gekoppelte fluoreszierende Farbstoffe werden durch Laser angeregt und durch Photodetektoren registriert. Dies ermöglicht das Zuordnen der Zellen zu diskreten Populationen.

Durchführung: Zu Beginn wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz auf eine Mikrotiterplatte überführt. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer (3min bei 1200rpm zentrifugieren, Überstand abkippen) wurden die Zellen mit 50µl FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte das Blocken der Fc-Rezeptoren mit CD16/32 (Einsatz 1:100) bzw. Serum 5% für 15min bei Raumtemperatur. Darauf folgte die Inkubation (20-30min) mit dem entsprechenden Antikörper bei 4°C. Bei Antikörpern, die nicht direkt an einen Farbstoff gekoppelt sind, folgte nach zweimaligem Waschen ein weiterer Inkubationsschritt mit einem Sekundärantikörper bzw. bei biotinylierten Antikörpern mit einem Streptavidin. Nach zwei letzten Waschschritten wurde die Zellsuspension in 200µl FACS-Puffer am FACS-CANTO II (BD) gemessen.

Intrazelluläre Färbung: Zur Detektierung intrazellulärer Antigene (TCL1), wurden die Zellen nach der Färbung der Oberflächenantigene mit dem FIX & PERM® Kit von Invitrogen aufgebrochen und fixiert. Zudem wurde das LIVE/DEAD® Kit von Invitrogen zum Anfärben der bereits toten Zellen verwendet. Alternativ wurden die Zellen mit 4%PFA für 10min fixiert, ohne eine anschließende Färbung toter Zellen.

### 2.2.5. Fluoreszenz gestütztes Zellsortieren (FACS)

Das FACS basiert im Wesentlichen auf der Technologie des Durchflusszytometers. Zusätzlich zur Erkennung verschiedener markierter Zellen erlaubt dieses Gerät jedoch die Sortierung der einzelnen Populationen zur weiteren Verwendung. Dies geschieht durch elektrische Aufladung einzelner Tropfen der Zellsuspension und der anschließenden Ablenkung der geladenen Tropfen in ein Auffanggefäß.

Durchführung:  $1 \times 10^8$  Zellen wurden in 5ml FACS-Puffer gefärbt, wobei die Antikörper 1.5x stärker verdünnt wurden (Inkubation 20min 4°C) als bei der regulären Durchflusszytometrie.

## Material & Methoden

---

Nach dem Färben erfolgte die Zugabe von 45ml FACS-Puffer sowie im Anschluss eine Zentrifugation bei 1200rpm für 10min. Danach wurden die gefärbten Zellpopulationen am BD FACS Aria getrennt und in 15ml Röhrchen mit 1ml FKS aufgefangen. Die Reinheit der sortierten Populationen betrug stets >95%.

### 2.2.6. Chemotaxis Assay

Das Chemotaxis Assay dient dem Funktionalitätsnachweis von Chemokinrezeptoren. Dazu wurden die Filter (Porengröße 5µm) einer 24-Well Transwell-Platte am Vortag mit Kollagen IV (20µg/ml) beschichtet. Am Tag darauf wurden die Böden der Platte mit Chemokin + Medium oder nur mit Medium gefüllt. Anschließend wurden die, zuvor mit  $1 \times 10^6$  Zellen bestückten, Filter eingesetzt (T-Zellen isoliert aus immundefizienten Mäusen s. 2.3.3.). Nach einer vierstündigen Inkubationsphase (37°C) wurde die Zahl der Zellen bestimmt, welche durch den Filter hindurch gewandert waren. Für jedes Chemokin wurden jeweils drei Löcher der Platte benutzt. Am Ende wurde aus den Zellzahlen ein Mittelwert bestimmt und, zur Bestimmung des Migrationsindex, durch den Wert der Kontrolle geteilt. Folgende Chemokine wurden eingesetzt: SDF1(25nM); CCL21(200nM)

Migrationsmedium: 40ml RPMI mit 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% BSA (40mg), 25mM Hepes (1ml 1M)

## 2.3. Tierexperimentelle Methoden

### 2.3.1. Mäuse

Der transgene Mausstamm Eµ-Tcl1<sup>78</sup> wurde über 10 Generationen in den C57.BL/6 Hintergrund innerhalb der Tiereinrichtung des Max Delbrück Zentrums für Molekulare Medizin, Berlin zurückgekreuzt. Eµ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup> Mäuse wurden durch Kreuzung der Eµ-Tcl1 Maus mit dem transgenen BCR<sup>HEL</sup> Mausstamm (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME; USA) am MDC generiert. *plt/plt* Mäuse, Rag2<sup>-/-</sup>, C57Bl/6 Ly5.1 und C57Bl/6 Ly5.2 Mäuse stammen ebenfalls aus der Zucht am MDC. Alle Tiere wurden entsprechend nationaler Richtlinien gehalten und Tiertötungen und Versuche waren vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (Berlin) (G 0373/13; G 0052/12) genehmigt.

### 2.3.2. Retrobulbäre Blutentnahme

Die retrobulbäre Blutentnahme stellt eine Möglichkeit dar, Informationen über den Zustand von Mäusen zu gewinnen ohne diese abtöten zu müssen. Dabei wird eine feine Glaskapillare unter Drehbewegung bis zum retrobulbären Venengeflecht vorgeschoben. Dieses wird dann punktiert

und das Blut anschließend in einem 1.5ml Eppendorfgesäß mit 50µl EDTA vermischt. Danach wurde das Blut für durchflusszytometrische Analysen verwendet.

### 2.3.3. Langzeit T-Leukämiezell Transfer

Zur Expandierung des Primärmaterials wurden  $4-6 \times 10^6$  maligne T-Zellen aus erkrankten Eµ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup> Mäusen i.v. in immundefiziente Rag-/- Mäuse transferiert. Neunzehn bis 23 Tage nach Transfer wurden die stark vergrößerten lymphatischen Organe der Empfängertiere aufgearbeitet und die T-Leukämiezellen (> 90% aller Lymphozyten / lymphatischem Organ) eingefroren. Das maligne Potential und die Wachstumskinetik der in Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen expandierten Leukämiezellen wurde durch adoptiven Transfer von  $5-10 \times 10^6$  Leukämiezellen in immunkompetenten C57Bl/6 Ly5.2 oder immunkompetenten kongenen C57Bl/6 Ly5.2 Mäusen untersucht. Im Durchschnitt erkrankten die immunkompetenten Empfängertiere zwei bis drei Wochen nach adoptivem Tumorzell-Transfer an einer Leukämie. Zu diesem Zeitpunkt wurden die erkrankten Empfängertiere getötet und die T-Leukämiezellen aus den stark vergrößerten lymphatischen Organen der isoliert und für weiterführende Experimente, z.B. Migrationsexperimente und RNA-Analysen, verwendet.

### 2.3.4. Migrationsexperimente

Zur Analyse des Migrationsverhaltens der T-Leukämiezellen wurden maligne T-Zellen aufgetaut, gewaschen und in 100 µl PBS aufgenommen. Anschließend erfolgte die Injektion der malignen T-Zellen ( $8 \times 10^7 / 100 \mu\text{l}$  PBS i.v.) in BL6 Ly5.1 Mäuse. Nach 1 Tag und 4 Tagen bzw. 1 Tag, 4 Tagen und 8 Tagen wurden die Tiere abgetötet und die Lokalisation der T-Leukämiezellen in Milz und Lymphknoten mittels Immunhistologie bestimmt. Um die Abhängigkeit des Migrationsverhaltens von Chemokinsignalen zu zeigen, wurden zudem T-Leukämiezellen in *plt/plt* Mäuse injiziert ( $1 \times 10^7$  i.v.). Die Aufarbeitung der Tiere erfolgte 8 Tage bzw. 10 Tage nach dem adoptiven Transfer.

### 2.3.5. Kompetitiver Transfer von DP und EP T-Leukämiezellen

Das proliferative Potential von EP und DP T-Leukämiezellen wurde durch den adoptiven und kompetitiven Transfer dieser Zellen getestet. Aufgetaute maligne T-Zellen von Klon 3 (Tab. 5) wurden für CD4 und CD8 gefärbt, was die anschließende Trennung der CD4/8 DP und CD4 EP Population im Zellsortierer ermöglichte. Maligne T-Zellen der beiden Population wurden getrennt bzw. 1:1 gemischt in BL6/Ly5.1 Mäuse injiziert ( $3 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$  PBS Zellen i.v.). Nach 13 Tagen wurde ein Tier von jeder Population geblutet und das Krankheitsstadium durchflusszytometrisch ermittelt. Nach 15 Tagen wurden alle Tiere zur Analyse abgetötet.

### 2.4. Histologische Methoden

#### 2.4.1. Gefrierschnitte

Organe einbetten: Nach der Präparation des Versuchstiers wurden die Organe in Cryomold-Förmchen mit Tissue-Tek® eingebettet. Die Förmchen wurden zum Einfrieren auf Trockeneis gelegt und nach dem Abschluss des Gefrierprozesses in einen -80°C-Tiefkühler überführt.

PFA Fixierung: Für bestimmte Färbungen (v.a. TCL1) wurden die Organe vor dem Einbetten fixiert. Dafür wurden die Organe je nach Größe für 8-12 Stunden in Fixationspuffer überführt. Anschließend wurden die Organe drei Mal für 1 Stunde in Phosphatpuffer gewaschen und danach in einer 30%-Succroselösung 4h dehydriert.

Schnitte anfertigen: Am Kryostat HM560 wurden 6µm dünne Schnitte produziert und auf Superfrost-plus Gläser gezogen. Diese wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und dann nach 10min Acetonfixierung bei -20°C (entfällt bei PFA-fixierten Schnitten) entweder bei -80°C eingefroren, oder direkt zum Färben verwendet.

Schnitte färben: Zuerst wurden die Schnitte 20min in PBS rehydriert. Darauf folgten 30min Inkubation mit Block-Lösung (5% Serum aus der Spezies des Primär-AK bzw. des Sekundär-AK wenn verwendet). Anschließend wurde für 1 Stunde mit der Antikörperlösung inkubiert (Fluoreszierende Antikörper vor Gebrauch 5min bei 13.000 x g zentrifugiert). Nach viermaligem Waschen mit PBS folgte, wenn nötig, der nächste Färbeschritt, z.B. mit Sekundärantikörpern, oder die Eindeckelung mit DABCO-Mowiol.

DABCO-Mowiol: 2.4g Mowiol, 4.2ml Glycerin 99.5%, 12ml 0.2M Tris pH8.5, 0.1%DABC

#### 2.4.2. Paraffinfixierte Schnitte

Organe fixieren: Nach der Entnahme wurden die Organe 24h-48h in 4% PFA fixiert. Darauf folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Anschließend wurden die Organe in Paraffin eingebettet, wozu die Organe für 12 Stunden, 4 Stunden und nochmals 4 Stunden in 60°C-warmem Paraffin inkubiert wurden. Nach dem letzten Paraffinwechsel wurden die Organe mit Paraffin in Metallförmchen ausgegossen und bei Raumtemperatur ausgehärtet.

Schnitte anfertigen: Nach dem Ablösen der Paraffinblöcke wurden am HM355s Mikrotom 6µm dünne Schnitte angefertigt und auf Objektträger übertragen. Anschließend wurden diese auf einer 37°C warmen Wärmeplatte getrocknet und mindestens 1 Stunde bei 60°C inkubiert.

HE Färbung: Die Hämatoxilin & Eosin Färbung wurde mit Hilfe eines Färbeautomaten durchgeführt. Die Färbung verlief wie folgt: Xylol 3x 3min, 100% Ethanol 2x2min, 95% Ethanol 1x2min, 80% Ethanol 1x2min, 5min H<sub>2</sub>O spülen, Hematoxilin 7min, H<sub>2</sub>O spülen 20min, 95%



Ethanol 1min, Eosin 2min, 100% Ethanol 4x1min, Xylol 3x2min. Die Objektträger wurden nach Abschluss der Färbung an einem weiteren Automaten mit Cytoseal XYL eingedeckelt.

Immunhistochemie: Im ersten Schritt wurden die Präparate entparaffiniert (20min Xylol) und rehydriert (5min 2xAceton:1xTris-Puffer pH7.6; 5min 1xAceton:2xTris-Puffer pH7.6). Anschließend erfolgte die Antigendemaskierung in einem Schnellkochtopf mit kochendem Citratpuffer (pH6). Darauf folgten verschiedene Blockierungsschritte: Endogener Peroxidase Block (5min 3% $H_2O_2$ ), Avidin-Biotin Block (5min Streptavidin, 5min Biotin), Serum Block (TNT-Puffer mit 5% Serum aus der Spezies des Sekundärantikörpers). Anschließend wurde über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag folgten weitere Inkubationsschritte mit den entsprechenden Sekundärantikörpern oder Streptavidinen (je 1 Stunde). Zuletzt wurden die Schnitte mit AEC Chromogen (Peroxidase gekoppelter AK), Fast-Blue Entwicklungspuffer (Alkalische Phosphatase gekoppelte AK) oder REAL Hämatoxinil gefärbt und mit Kaisers Glyceringelantine eingedeckelt.

## 2.5. Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1. Isolation von RNA

Für die RNA-Isolation wurden sortierte DP T-Leukämiezellen nach Passage durch BL6 Ly5.1 Mäuse sowie DP Thymozyten von Wildtyp (wt) Mäusen verwendet. Nach der erfolgreichen Zellsortierung wurden  $1 \times 10^7$  Zellen für die Isolation von RNA eingesetzt. Diese erfolgte mit Hilfe des RNeasy mini Kits von Qiagen, welches auf der Bindung der RNA an eine Silica-Membran beruht. Die Membran befindet sich in einer zentrifugierbaren Säule, welche das Auswaschen jeglicher Verunreinigungen ermöglicht.

Vor der Auftragung auf die Membran wurden die Proben zur Denaturierung und Verringerung der DNA Kontamination mit  $\beta$ -Mercaptoethanol und RLT-Puffer behandelt. Durch Hinzufügen von Ethanol wurde die RNA spezifisch an die Membran gebunden. Nach mehreren Waschschrinen folgten 15min Inkubation mit DNase (Qiagen). Nach weiterem Waschen konnte die RNA in 30 $\mu$ l  $H_2O$  eluiert werden.

### 2.5.2. Isolation genomischer DNA

Für die DNA Isolierung wurden ebenfalls sortierte T-Leukämiezellen bzw. Thymozyten verwendet. Zwischen  $1 \times 10^7$  und  $3 \times 10^7$  Zellen wurden in 500 $\mu$ l Zell-Lyse-Puffer aufgenommen und über Nacht (12-18h) bei 55°C inkubiert. Am Folgetag wurde nach Zentrifugation bei 13000rpm für 10min die wässrige Phase abgenommen. Durch Hinzufügen eines gleichen Volumenanteils Isopropanol wurde die DNA ausgefällt um anschließend per Zentrifugation

pelletiert zu werden. Das Pellet wurde mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und an der Raumluft getrocknet. Die Resuspension der DNA erfolgte mit H<sub>2</sub>O durch Inkubation bei 55°C für 30-60min.

### 2.5.3. Quantifizierung von DNA und RNA sowie Messung der Qualität

Die Quantifizierung der gewonnenen DNA und RNA erfolgte am NanoDrop Spectrophotometer. Anschließend wurde die Qualität der RNA mittels Chip-basierter Gelelektrophorese bestimmt. Das allgemeine Prinzip gleicht der konventionellen Gelelektrophorese. Der Hauptunterschied besteht im hohen Grad der Miniaturisierung. Zur Durchführung wurden die RNA-Proben für 2min bei 70°C denaturiert und mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit gemessen (Protokoll siehe Hersteller). Die Qualität der RNA wird an Hand der RIN (RNA Integrity Number von 1-10) ausgedrückt, welche auf einem Algorithmus beruht, in den verschiedene Parameter aus der elektrophoretischen Messung eingehen. Für die qPCR wurden nur Proben mit RIN > 8 eingesetzt.

### 2.5.4. Reverse Transcriptase-Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR)

Um die RNA für qPCR Arrays einsetzen zu können, musste zunächst die Umschreibung der RNA durch Reverse Transkriptasen in cDNA erfolgen. Dies geschah mit Hilfe des RT<sup>2</sup>-First Strand Kits von Qiagen (Protokoll siehe Hersteller), wobei von jeder Probe die gleiche Menge RNA eingesetzt wurde (1µg).

### 2.5.5. Polymerase Ketten Reaktion zum Nachweis von *notch1* Deletionen

Der Nachweis von Typ 1 und Typ 2 Deletionen erfolgte mittels PCR. Die Primer zum Nachweis der Deletionen wurden bereits in anderen Publikationen beschrieben: Del1F und Del1R von Aster et al. sowie Del2F und Del2R von Zhang et al.<sup>83,84</sup> Beide Primerpaare rahmen jeweils einen häufig deletierten Bereich des *notch1* Gens ein. Mittels PCR wurden diese Bereiche amplifiziert. Hatte keine Deletion stattgefunden, so zeigte die anschließende Gelelektrophorese ein ca. 12kb bzw. 5kb langes Transkript. Hatte eine Deletion stattgefunden, so würde die Auftrennung nur ein Transkript von 300bp bis 400bp Länge ergeben.

Der Nachweis von Deletion 1 wurde auf genomischer DNA Ebene geführt. Die 25µl Reaktionsvolumen setzten sich aus 15.6µl H<sub>2</sub>O, 5µl Puffer (aus Polymerase Kit), 0.75µl DMSO, 0.75µldNTPs, 0.2µl Del1F, 0.2µl Del1R, 0.5µl MgCl, 1µl Polymerase. Als Polymerase wurde die LongAmp Taq-Polymerase von NEB verwendet.

Der Ablauf der PCR war wie folgt:

- |                   |           |
|-------------------|-----------|
| 1. 94°C für 30s   | 35 Zyklen |
| 2. 94°C für 30s   |           |
| 3. 62°C für 1min  |           |
| 4. 65°C für 11min |           |
| 5. 65°C für 10min |           |

Der Nachweis für Deletion 2 wurde auf cDNA Ebene geführt, um die Transkriptlänge zu reduzieren. Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 50µl durchgeführt. Dieses setzte sich wie folgt zusammen: 34,5µl H<sub>2</sub>O, 10µl 5x HF Puffer, 1µl dNTP (10mM), 1µl von PrimerA und PrimerB (50mM), 0.5µl Polymerase, 2µl DNA/cDNA (ca.200ng). Der Ablauf der PCR war wie folgt:

- |                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| 1. 98°C für 30s               | 35 Zyklen |
| 2. 98°C für 10s               |           |
| 3. 57.5°C für 30s             |           |
| 4. 72°C für 5min bzw. 2:30min |           |
| 5. 72°C für 10min             |           |

Der Nachweis der PCR Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese bei 100V in einem 0.8% Aggarose Gel mit TAE Laufpuffer. Als Laufmarker für die DNA wurde Orange G verwendet. Zur Visualisierung der Banden wurden zu 150ml Gel 10µl Ethidiumbromid zugefügt. Zum Auslesen der Gele wurde das GeneGenius Bio Imaging System von Syngene verwendet.

### 2.5.6. Quantitative Real Time PCR (qPCR)

Die qPCR ist eine Methode, welche mit Hilfe von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen die DNA während der PCR quantifizierbar macht. Durch den Vergleich mit stabil exprimierten House-Keeping-Gen (HKG) Kontrollen kann eine Aussage über die Expression von Zielgenen getroffen werden. Die qPCR Analyse wurde mit 96 well RT<sup>2</sup>-Profiler PCR Arrays von Qiagen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. In 84 Wells der Array Platten befinden sich spezifische Primer für je eine cDNA, sodass nur diese amplifiziert wird. Mittels der proportional zur cDNA Menge steigenden Fluoreszenz wird für jedes Gen der Zeitpunkt ermittelt, zu dem eine fixe cDNA Menge erreicht wurde (C<sub>T</sub>-Wert). Die Differenz dieses Wertes zu dem der HKG-Kontrolle dient als Maß für die relative Expression des Zielgens (ΔC<sub>T</sub>). Weitere mathematische Analysen nach der ΔΔC<sub>T</sub> Methode erleichtern die Interpretation der Daten. Die mathematische Analyse wurde mit Excel und der Internetversion des RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis Programms von SABioscience durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

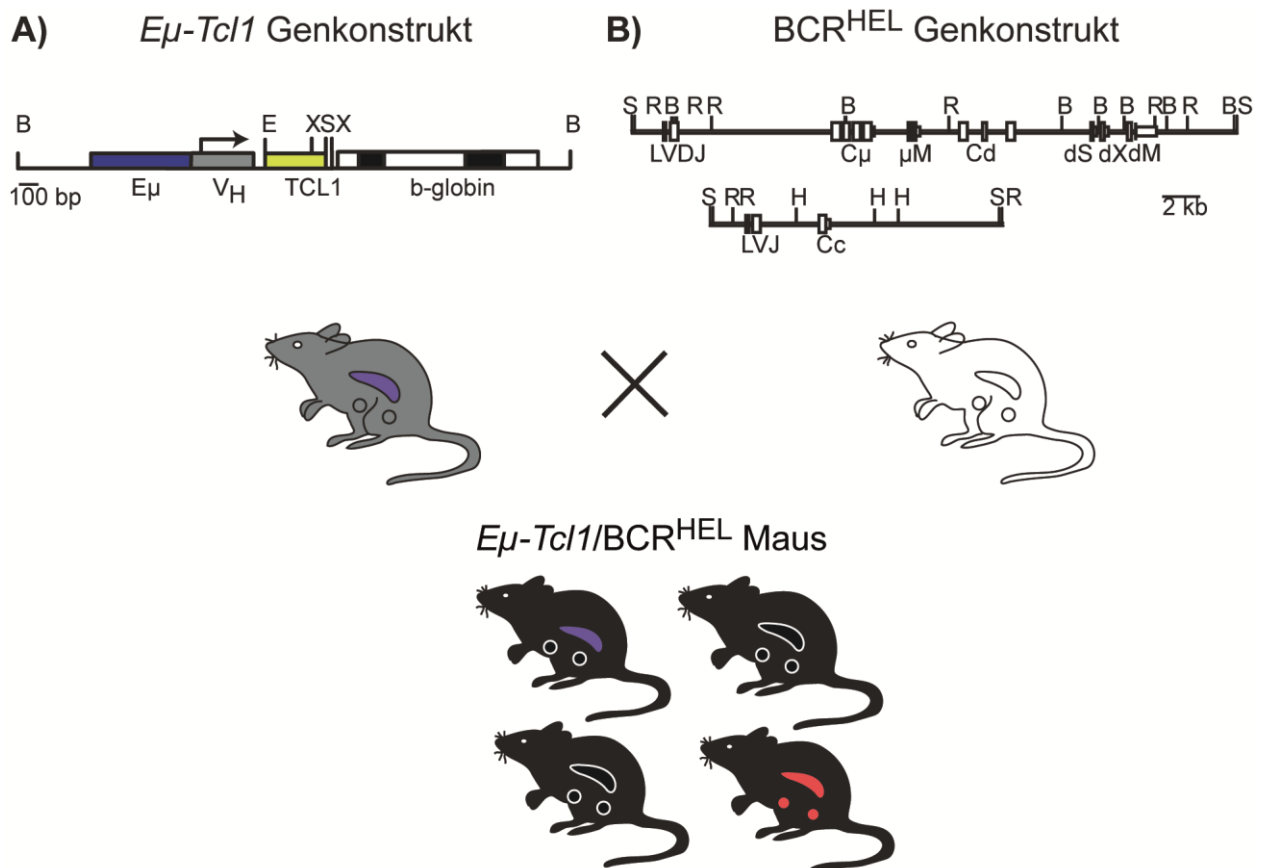
#### 3.1. Die *E $\mu$ -Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Maus

##### 3.1.1. Die *E $\mu$ -Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Maus zeigt keine BCR<sup>HEL</sup> positive B-Zell-Leukämie

In der Arbeitsgruppe konnte kürzlich im *E $\mu$ -Tcl1* Mausmodell für Chronisch Lymphatische B-Zell-Leukämie (B-CLL) eine Assoziation von malignen B-Zellen mit Stromazellen der B-Zell Zone, vornehmlich Follikuläre Dendritische Zellen (FDZ), gezeigt werden. B-Leukämiezellen, die zu dieser Assoziation fähig waren, zeigten einen Proliferationsvorteil gegenüber B-Leukämiezellen, welche durch Knock-Out des Chemokinrezeptors 5 (CXCR5) an der Einwanderung in den B-Zellfollikel gehindert wurden.<sup>85</sup> Eine mögliche Erklärung für den Wachstumsvorteil, welchen die B-Leukämiezellen durch ihre Assoziation mit Stromazellen erhalten, ist die Stimulation des B-Zell Rezeptors (BCR) durch Antigenpräsentation. Um die Rolle von Antigenpräsentation im Entartungsprozess zu untersuchen, wurde die *E $\mu$ -Tcl1* Maus (Abbildung 5A) mit der BCR<sup>HEL</sup> Maus (Abbildung 5B) gekreuzt. Die BCR<sup>HEL</sup> Maus weist zum Großteil B-Zellen auf, deren BCRs gegen Hen Egg Lysozyme (HEL) gerichtet sind. Im *E $\mu$ -Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mausstamm könnte dadurch die Antigenexposition von malignen B-Zellen gezielt gesteuert werden. Aufgrund des *tcl1* Onkogen-Konstrukts in den doppelt transgenen *E $\mu$ -Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mäusen ließ sich, ähnlich dem *E $\mu$ -Tcl1* Mausstamm, eine hohe Inzidenz von B-Zell-Leukämien erwarten. Zunächst sollte die Inzidenz von B-Zell-Leukämien im *E $\mu$ -Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mausstamm ohne die zusätzliche Stimulation mit HEL ermittelt werden. Anschließend sollte dann geprüft werden, welche Veränderung die Stimulation mit HEL bewirkt. Sowohl ohne als auch mit Stimulation durch das HEL Antigen konnte keine Entwicklung von BCR<sup>HEL</sup> positiver B-CLL beobachtet werden.<sup>85</sup> Die Frequenz von B-Zell-Leukämien war insgesamt erniedrigt und verzögert, wobei alle in den *E $\mu$ -Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mäusen letztendlich entstandenen B-Zell-Leukämien BCR<sup>HEL</sup> negativ waren und dem B-CLL Phänotyp des *E $\mu$ -Tcl1* Mausstamm glichen. Offensichtlich war die Stimulation der malignen B-Zellen über einen auf ein einziges Antigen restringierten BCR nicht ausreichend, um eine Entartung der B-Zellen zu ermöglichen.<sup>85</sup> Interessanterweise zeigte sich im *E $\mu$ -Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mausstamm stattdessen eine erhöhte Frequenz von Tieren mit einer überdurchschnittlichen Proliferation von T-Zellen, was auf das Vorliegen einer T-Zell Leukämie hindeutete.

### 3.1.2. $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mäuse zeigen eine malignitätsverdächtige T-Zell Proliferation

Die malignitätsverdächtige T-Zell Proliferation in den lymphatischen Organen der transgenen  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Tiere wurde per durchflusszytometrischer Analyse näher untersucht. Von 23 an einer Leukämie erkrankten  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mäusen konnten 7 Mäuse identifiziert werden, in denen die Lymphozytenpopulation fast ausschließlich aus CD5<sup>+</sup> T-Zellen bestand (Tabelle 5). Diese T-Zellproliferation zeigte sich ebenfalls in den Lymphknoten sowie im peripheren Blut und in der Haut (s. 3.9.2) der betroffenen Tiere. Bei dieser, die B-Zellpopulation verdrängenden, T-Zell Proliferation handelt es sich wahrscheinlich um Fälle von T-Zell-Leukämie.



**Abbildung 5** Die  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Maus entsteht aus der Kreuzung der  $E\mu$ -*Tcl1* Maus mit der BCR<sup>HEL</sup> Maus. In A) und B) sind die Genkonstrukte der  $E\mu$ -*Tcl1* und der BCR<sup>HEL</sup> Maus gezeigt. Die  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Maus zeigte eine erhöhte Inzidenz einer T-Zell Proliferation in Milz und Lymphknoten im Vergleich zum  $E\mu$ -*Tcl1* Mausstamm.

Im weiteren Verlauf wurden diese Fälle von T-Zell Proliferation im Hinblick auf ihre Malignität und ihren Immunphänotyp charakterisiert. Zudem sollte durch Transferexperimente und molekularbiologische Analysen ein Einblick in den Entstehungsprozess dieser T-Zell Proliferation gewonnen werden.

## Ergebnisse

Möglicherweise kann durch die Charakterisierung dieser T-Zell Proliferation geklärt werden, warum sie im *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamm gehäuft auftritt und ob dieses gehäufte Auftreten in kausalem Zusammenhang mit der reduzierten Frequenz von B-Zell-Leukämien steht.<sup>85</sup>

**Tabelle 5** *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäuse mit T-Zell Proliferation. Prozentangaben entsprechen dem Anteil an den Lymphozyten der Milz

| Klon       | Alter in Tagen | T-Zellen (CD5 <sup>+</sup> ) | B-Leukämiezellen (CD5 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> ) |
|------------|----------------|------------------------------|--|
| 1 (#2053)  | 276            | 91.3%                        | 0.65%  |
| 2 (#2067)  | 356            | 90.8%                        | 5.9%   |
| 3 (#13919) | 279            | 89.8%                        | 0.1%   |
| 4 (#2985)  | 177            | 93.3%                        | 0.4%   |
| 5 (#2058)  | 268            | 98.1%                        | 0.6%   |
| 6 (#2045)  | 311            | 85.2%                        | 0.7%   |
| 7 (#14861) | 325            | 48.9%                        | 5.8%   |

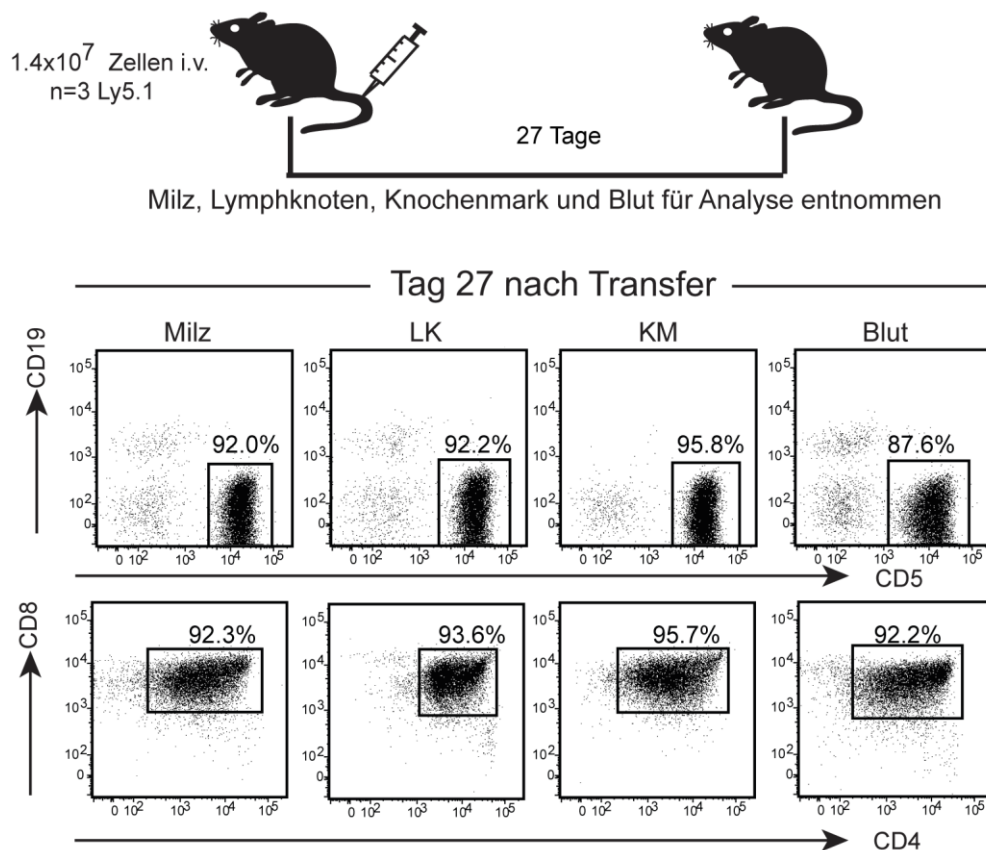
### 3.2. Die T-Zellproliferation im *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamm ist maligne

#### 3.2.1. Malignitätsverdächtige T-Zellen sind zur Proliferation in immunkompetenten Mäusen fähig

Zunächst sollte mittels Transferexperimenten geklärt werden, ob es sich bei der T-Zell Proliferation im *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Stamm um einen malignen Prozess oder eine benigne Expansion handelte. Dazu wurden aus transgenen Mäusen mit T-Zell Proliferation Splenozyten isoliert und zunächst 2 Klone, zur Vermehrung des Probenmaterials, in immundefizienten Mäusen expandiert. Über 90% der Lymphozytenpopulation in den Milzen der Empfängertiere bestand nach einem Zeitraum von 2-3 Wochen aus T-Zellen. Da es sich bei den Empfängertieren jedoch um immundefiziente Mäuse handelte, konnte mit dieser Expansion die Malignität der T-Zellen noch nicht eindeutig bewiesen werden.

In einem zweiten Experiment wurden expandierte T-Zellen aus immundefizienten Mäusen isoliert und in immunkompetente Mäuse injiziert. Sowohl für Klon 1 als auch für Klon 2 konnte eine Expansion in kongenen C57Bl/6 (B6) Ly5.1 Mäusen gezeigt werden. Nach 27 Tagen konnten beim Transfer von Klon 1 in Blut, Knochenmark, Milz und Lymphknoten über 90% T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 6). Dass es sich hierbei um eine Expansion der

injizierten Zellen handelte, konnte über deren Ly5.2 Positivität sowie über den CD4/8 doppelt positiven Phänotyp (DP), welcher für die T-Leukämiezellen charakteristisch ist (s. 3.4.1), gezeigt werden. Die Fähigkeit dieser T-Zellen zur Expansion in immunkompetenten Mäusen beweist ihre Malignität. Bei den T-Zellexpansionen der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäuse handelt es sich um eine T-Zell-Leukämie.



**Abbildung 6 Expansion von CD4/CD8 DP T-Leukämiezellen in B6 Mäusen**  $1.4 \times 10^7$  T-Zellen von Klon 1 wurden nach der Expansion in immundefizienten Mäusen in  $n=3$  immunkompetente B6 Ly5.1 Mäuse transferiert (8 Wochen alt). Die Dotplots zeigen die durchflusszytometrische Analyse des Tumorgehalts in mehreren Organen. Die Lymphozytenpopulation besteht fast ausschließlich aus T-Zellen. Die T-Zellen zeigen zum Großteil den für die T-Leukämiezellen charakteristischen CD4/CD8 DP Phänotyp (s. 3.4.1).

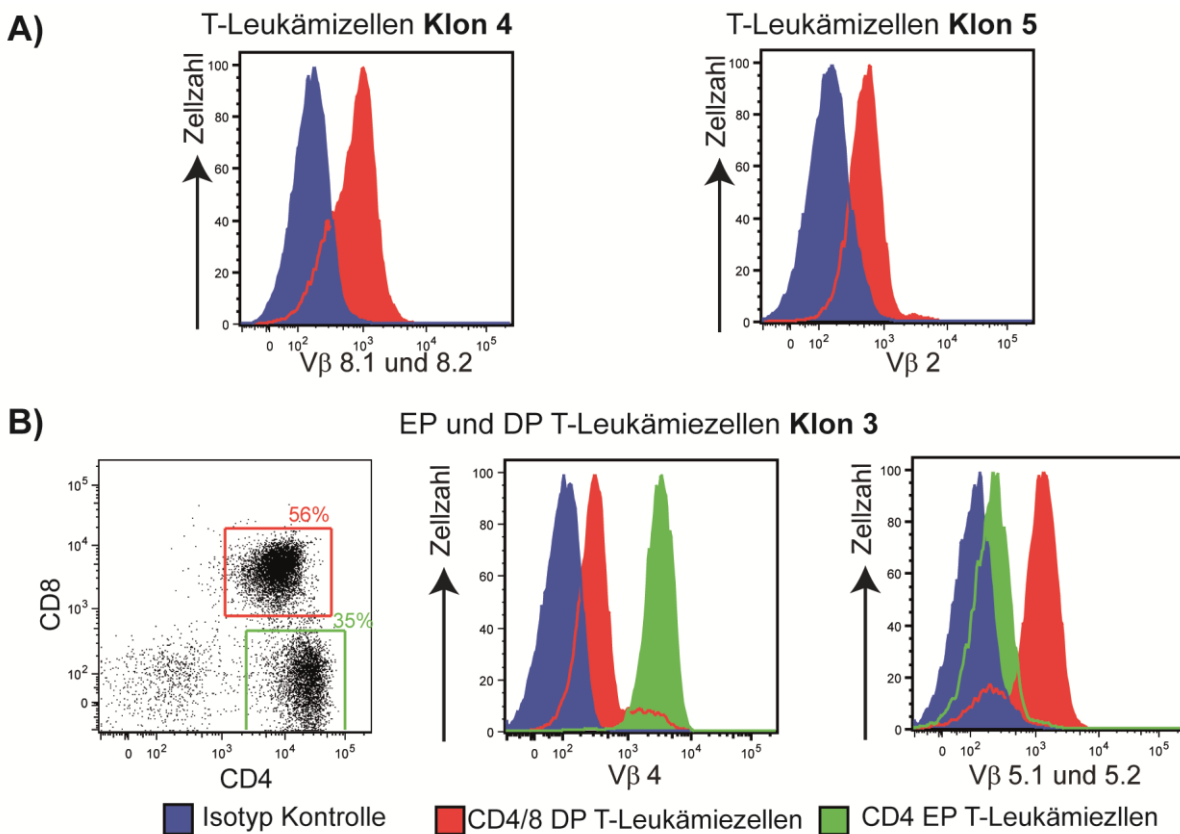
Für Klon 1 wurde in einem weiteren Transferexperiment der Tumorgehalt an mehreren Tagen bestimmt um eine Übersicht über den Krankheitsverlauf zu gewinnen. Dazu wurden  $1,2 \times 10^7$  T-Leukämiezellen von Klon 1 aus immundefizienten Mäusen in immunkompetente B6 Mäuse injiziert. Es zeigte sich eine Expansion der T-Leukämiezellen in SLOs. Besonders rasch verlief die Expansion in der Milz. Bereits nach 12 Tagen machten T-Leukämiezellen 76% der Splenozyten aus. In den Lymphknoten verlief die Expansion langsamer. Der Anteil der T-

## Ergebnisse

Leukämiezellen betrug hier am 12. Tag erst 14%. Zudem wurde der Thymus als primäres lymphatisches Organ untersucht. Hier konnte ebenfalls eine Expansion der malignen T-Zellen nachgewiesen werden, welche am 12. Tag 35% erreichte.

### 3.2.2. *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäuse zeigen eine monoklonale T-Zell-Leukämie

Als nächstes wurde die Klonalität der T-Leukämiezellen mittels durchflusszytometrischer Analyse der Oberflächenexpression 15 verschiedener Subtypen von TZR V $\beta$ -Ketten untersucht. Es wurden 5 Klone analysiert. Von den 5 analysierten Klonen konnte für Klon 1 und 2 keine klare Positivität für einen bestimmten V $\beta$ -Subtyp gezeigt werden. Klon 4 und 5 hingegen waren positiv für einen bestimmten V $\beta$  Typ (Abbildung 7A), was nahelegt, dass es sich hierbei um monoklonale Tumorphysen handelt. Klon 3 zeigte Positivität für zwei V $\beta$ -Typen (Abbildung 7B).



**Abbildung 7 Klonalität von 3 T-Leukämiezell Proben im V $\beta$  Screen** Die Histogramme zeigen Ausschnitte aus einem durchflusszytometrischen Screening für eine Reihe von Varianten der V $\beta$ -Kette des T-Zell Rezeptors (TZR). Die Durchflusszytometrie wurde an kryokonservierten T-Leukämiezellen durchgeführt, welche aus den Milzen von *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäusen isoliert wurden (Klon 3-5, Tabelle 5). **A)** Dargestellt ist die Analyse zweier Klone, welche eine DP T-Leukämiezellpopulation zeigen. **B)** Hier ist die Analyse eines Klons gezeigt, welcher sowohl DP T-Leukämiezellen sowie vorher noch nicht charakterisierte CD4 EP T-Zellen aufweist. Der Dotplot zeigt die Anteile von CD4 EP T-Leukämiezellen und CD4/8 DP T-Leukämiezellen von Klon 3.



Die Monoklonalität der untersuchten T-Zell-Leukämie Klone unterstreicht die Annahme, dass es sich bei diesen Zellen um maligne transformierte T-Zellen handelt. Die Biklonalität der V $\beta$ -Expression von Klon 3 lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass zusätzlich zu den klassischen CD4/8 DP T-Leukämiezellen eine zweite Population von CD4 einfach positiven (EP) T-Zellen vorhanden ist, bei denen es sich vermutlich um eine Variante des T-Zell-Leukämie Phänotyps handelt (s. 3.4.2). Nach der Analyse der Klonalität der T-Zell-Leukämie sollte als nächstes die Expression von TCL1 in  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mäusen geprüft werden

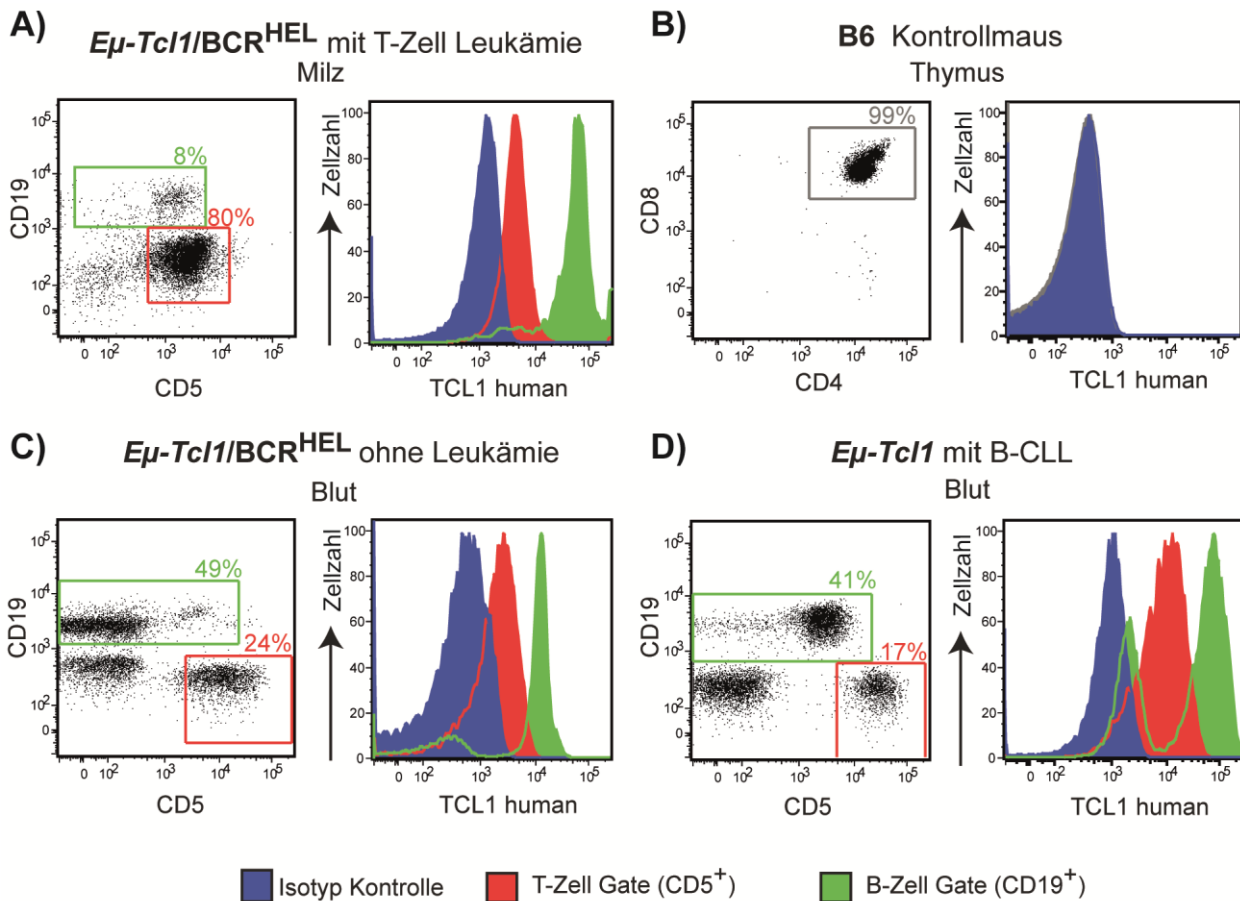
### 3.3. T-Zellen im $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> und im $E\mu$ -*Tcl1* Mausstamm sind zur Expression von TCL1 fähig

Das treibende Onkogen für die Entwicklung von B-Zell-Leukämie im  $E\mu$ -*Tcl* und  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mausstamm ist das *T-Cell Leukemia/Lymphoma 1* (*tcl1*) Gen. Das humane Transgen wird unter der Kontrolle des B-Zell-spezifischen  $E\mu$ -Promoters eingebracht und bewirkt so die maligne Transformation der B-Zellen. Nachdem Transferexperimente gezeigt hatten, dass es sich bei der T-Zell Proliferation der  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mäuse um eine T-Zell-Leukämie handelt, sollte geprüft werden, ob dies auf eine Expression von TCL1 in T-Zellen zurückzuführen war. Möglicherweise war es in einigen Mäusen des  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Stamms zur Expression des *tcl1* Onkogens außerhalb der Kontrolle des B-Zell-spezifischen  $E\mu$ -Promoters gekommen, was die Entstehung von T-Leukämiezellen begünstigt hatte. Die Positivität der T-Leukämiezellen für das humane *tcl1* Transgen wurde mittels Durchflusszytomtrie geprüft. Durch den intrazellulären Nachweis des humanen TCL1 Proteins mit einem spezifischen Antikörper konnte auf die Expression des transgenen *tcl1* Onkogens zurückgeschlossen werden. Die Analyse aller 7 T-Leukämie Mäuse zeigte homogene Positivität aller T-Leukämiezellen für TCL1 (Abbildung 8A). Der Großteil sowohl der gesunden B-Zellen als auch der B-Leukämiezellen zeigte eine starke Expression von TCL1. DP Thymozyten aus B6 Kontrollmäusen hingegen waren negativ für das humane TCL1 (Abbildung 8B). Mit dem *tcl1* Onkogen war also eine potentielle Ursache für die maligne Transformation der T-Zellen gefunden. Offensichtlich war in den von T-Zell-Leukämie betroffenen Tieren die Beschränkung der TCL1 Expression auf B-Zellen aufgehoben.

Nach dem Nachweis der TCL1 Expression in T-Leukämiezellen wurde diese Färbung bei einer Blutkontrolle von  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Tieren ohne B- oder T-Zell-Leukämie verwendet. Dabei konnten in allen Mäusen, unabhängig von ihrem Krankheitsstatus, T-Zellen nachgewiesen werden, die positiv für das TCL1 Protein waren (Abbildung 8C). Dieses Ergebnis konnte in 4

## Ergebnisse

aufeinander folgenden monatlichen Messungen bestätigt werden. In 2 zur Kontrolle abgetöteten *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäusen ohne Leukämie konnte gezeigt werden, dass dieses Ergebnis nicht auf Lymphozyten aus dem Blut begrenzt war. Die Annahme, dass es sich bei der Erlangung der TCL1 Expression durch T-Zellen um ein sporadisches Ereignis handelt, scheint durch dieses Ergebnis unwahrscheinlich. Offensichtlich liegt hier ein nicht-sporadischer Effekt vor, der es den T-Zellen von Mäusen des *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Stamms erlaubt, trotz der Kontrolle durch den *Eμ*-Promoter das *tcl1*-Onkogen zu exprimieren.



**Abbildung 8 Alle T-Zellen sind positiv für TCL1** Die Dotplots zeigen die Anteile von CD5<sup>+</sup> T-Zellen, CD19<sup>+</sup> B-Zellen an der Lymphozytenpopulation der jeweiligen Probe. Die B-Zell Population schließt CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> B-Leukämiezellen mit ein. Die Histogramme zeigen eine repräsentative Darstellung der intrazellulären Durchflusszytometrie zum Nachweis des TCL1 Proteins. Es wurden unterschiedliche Mausstämme analysiert, n=7 *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäuse mit T-Leukämie (177-365 Tage), n=23 *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäuse ohne T-Leukämie (40-249 Tage), n=9 *Eμ-Tcl1* Mäuse (145-176 Tage), n=1 B6 Kontrollmaus (14 Wochen).

Dieser Effekt scheint nicht allein in *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäusen aufzutreten. In sämtlichen zur Kontrolle gefärbten Blutproben von 9 einfach transgenen *Eμ-Tcl1* Mäusen zeigte sich das gleiche Muster der TCL1 Positivität in der B- und T-Zell Population (Abbildung 8D)

Die ubiquitäre TCL1 Expression in B- und T-Lymphozyten des *Eμ-Tcl1* und des *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamms erschwert die Interpretation der Rolle von TCL1 für die Leukämieentstehung. Auf Grund der Rolle von TCL1 in der Transformation der B-Zellen kann jedoch angenommen werden, dass TCL1 auch eine Rolle bei der Transformation der T-Zellen spielt. Ungewiss ist allerdings, wie zentral diese Rolle für die Umwandlung der T-Zellen in maligne Leukämiezellen ist.

### 3.4. Die T-Leukämiezellen zeigen einen unreifen CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Phänotyp

#### 3.4.1. CD4/8 doppelt positive T-Leukämiezellen tragen CCR7 und CD62L

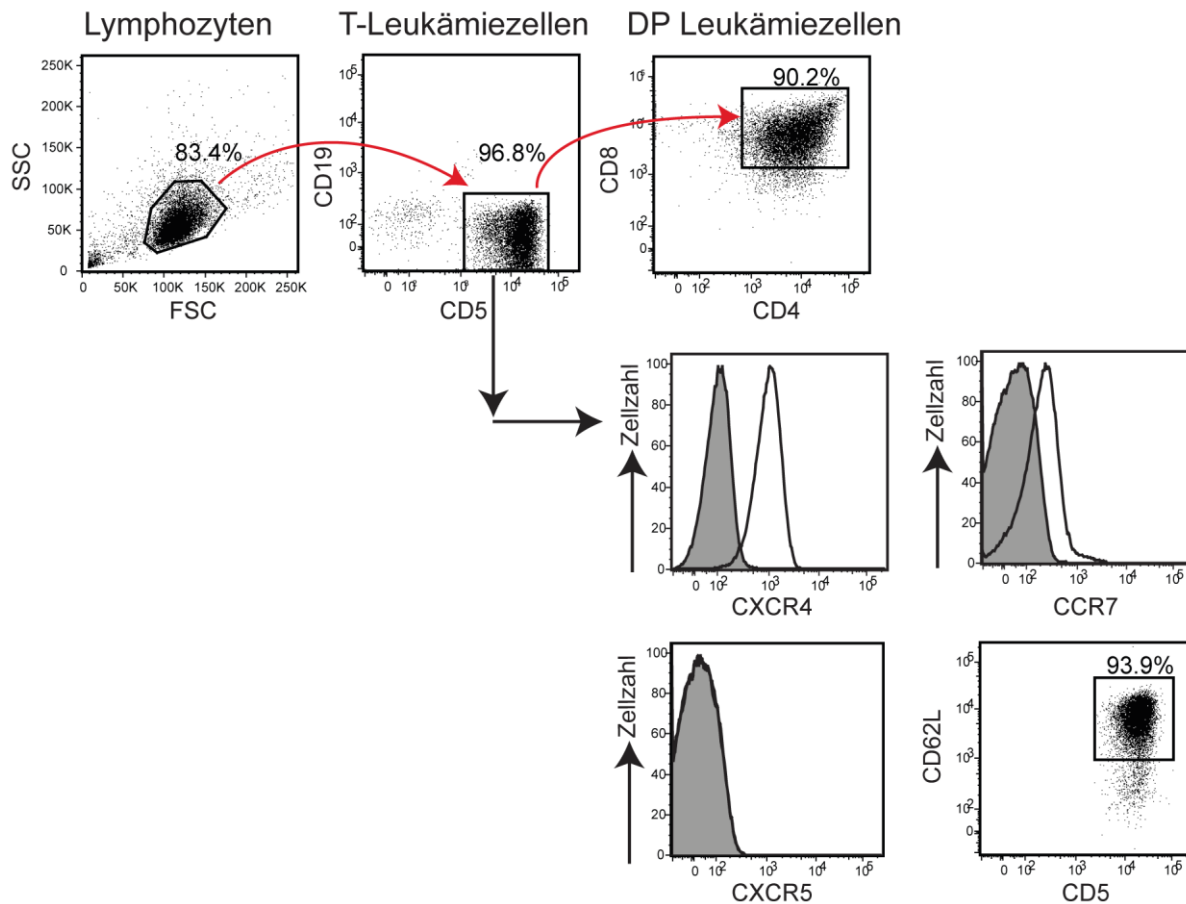
Per Durchflusszytometrie konnte ein CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Phänotyp der T-Leukämiezellen ermittelt werden. Zudem wurde die Oberflächenexpression von sogenannten „Homing-Rezeptoren“, den Chemokinrezeptoren, geprüft. Zuerst wurden anhand von Zellvolumen (Vorwärtsstreulicht=FSC) und Zellgranularität (Seitwärtsstreulicht=SSC) alle nicht-Lymphozyten von der Analyse ausgeschlossen. Anschließend wurden die T-Zellen über ihre CD5 Positivität von CD19 positiven B-Zellen abgegrenzt, um dann ihre Positivität in Bezug auf weitere Marker zu testen (Abbildung 9). Dabei zeigte die Analyse von Klon 1 und 2 einen CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>-</sup> T-Zellphänotyp. CD4/8 DP T-Zellen kommen physiologisch vor allem im Thymus vor. Dort konstituieren sie die letzte Stufe der T-Zellentwicklung vor der Ausdifferenzierung in naive CD4 oder CD8 einfach positive EP T-Zellen. Da periphere, reife T-Zellen nur äußerst selten CD4 und CD8 DP sind, konnte dieses Merkmal der T-Leukämiezellen in Experimenten zu deren Identifizierung genutzt werden. Klon 1 und 2 teilen den gleichen Phänotyp, Klon 2 zeigte jedoch eine Besonderheit im Krankheitsverlauf. Mittels regelmäßiger Blutanalysen konnte für Klon 2 vor dem Entstehen der DP T-Zell-Leukämie eine B-Zell-Leukämie nachgewiesen werden. Im Alter von 270 Tagen waren 41.3% der Lymphozyten im Blut der Maus CD5<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> B-Leukämiezellen. Im Alter von 356 Tagen waren nur noch 5% B-Leukämiezellen und 90.8% T-Leukämiezellen nachweisbar. Ob ein kausaler Zusammenhang zwischen B-Zell und T-Zell-Leukämie in dieser Maus besteht, war unklar.

Der charakteristische DP Immunphänotyp der T-Zell-Leukämie konnte sowohl auf den primären T-Leukämiezellen von Klon 1 und 2 als auch nach der Passage der T-Leukämiezellen durch immundefiziente und immunkompetente Empfängermäusen gezeigt werden (Abbildung 6).

Zusätzlich zu diesen T-Zellmarkern wurden Chemokinrezeptoren und Selektine, entscheidende Oberflächenmoleküle für eine gerichtete Zellmigration, getestet (Abbildung 9). Der CXCR4<sup>+</sup>, CXCR5<sup>-</sup>, CCR7<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup> Phänotyp lässt auf die Fähigkeit zur Migration in Lymphknoten und

## Ergebnisse

Milz schließen (s. 1.1.5). Zudem spielen Chemokinrezeptoren eine wichtige Rolle in der Migration von malignen T- und B-Lymphozyten. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass CCL19 über die Stimulation des Rezeptors CCR7 zur Migration von T-ALL Zellen in die Milz führt (s. 1.3.3).<sup>81</sup> Für die Besiedlung von Lymphknoten durch neoplastische T-Zellen im Rahmen des Sezary Syndroms ist ebenfalls CCR7 verantwortlich (s.1.2.2). Möglicherweise kommt der Kommunikation über Chemokinrezeptoren in den T-Leukämiezellen eine ähnliche Bedeutung für Lokalisation und Wachstums zu.



**Abbildung 9 Unreifer CD4/8 DP Phänotyp der T-Leukämiezellen** Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von expandierten Klon 1 Lymphozyten. Zuerst wurde ein Lymphozyten-Gate anhand von FSC und SSC angelegt. Anschließend wurde CD5 als Marker verwendet, um ein Gate für T-Zellen zu definieren. Die CD4/CD8 Färbung zeigt, dass es sich bei den T-Leukämiezellen um DP T-Leukämiezellen handelt. Die Histogramme zeigen die Analyse der Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR5 und CCR7. Grau schattierte Kurve = Isotypkontrolle. Die Dotplots zeigen die Analyse der CD4/CD8 Positivität sowie der Positivität für CD5 und CD62L. Repräsentative Darstellung für n=4, 17 Wochen alte Rag<sup>-/-</sup> Mäuse 23 Tage nach Transfer von  $8 \times 10^6$  T-Zellen.

### 3.4.2. Die Ausprägung des DP T-Leukämie Phänotyps variiert

Nachdem für Klon 1 und 2 ein CD4/8 DP Phänotyp ermittelt werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob die anderen Klone (Tabelle 5) den gleichen Phänotyp zeigten. Dazu

wurden Milzzellen aller restlichen Klone mit T-Zell-Leukämie aus der Stickstofflagerung aufgetaut, um anschließend per Durchflusszytometrie die T-Leukämiezellen auf ihre CD4 und CD8 Positivität hin zu untersuchen. Überraschenderweise konnte der charakteristische DP Phänotyp nicht bei all diesen Klonen nachgewiesen werden. Vier von sieben Klonen zeigten den typischen DP Phänotyp. Zwei Klone, Klon 3 und 7, zeigten ähnlich große Populationen von DP-Leukämiezellen und CD4 EP T-Zellen (Klon 3 53.6% DP, 38.9% EP; Klon 7 45.5% DP, 39.8% EP). Klon 4 zeigte fast ausschließlich CD4 EP T-Zellen (82% EP vs 17.7% DP). Bei der CD4 EP Population handelt es sich vermutlich ebenfalls um T-Leukämiezellen, da in Klon 4 trotz des Fehlens von DP T-Leukämiezellen fast die gesamte Lymphozytenpopulation von den CD4 EP T-Zellen dominiert wird und, wie in 3.2.2 gezeigt, eine Monoklonalität vorliegt. Geht man davon aus, dass es sich bei den CD4 EP T-Zellen ebenfalls um Leukämiezellen handelt, könnte das Vorliegen zweier Leukämiezellpopulationen bei Klon 3 die Biklonalität in der V $\beta$  Untersuchung erklären (Abbildung 7). Damit wären die CD4 EP T-Leukämiezell Population und die DP T-Leukämiezell Population jeweils für sich genommen monoklonal, ein weiterer Anhaltspunkt dafür, dass es sich bei den CD4 EP T-Zellen ebenfalls um Leukämiezellen handelt.

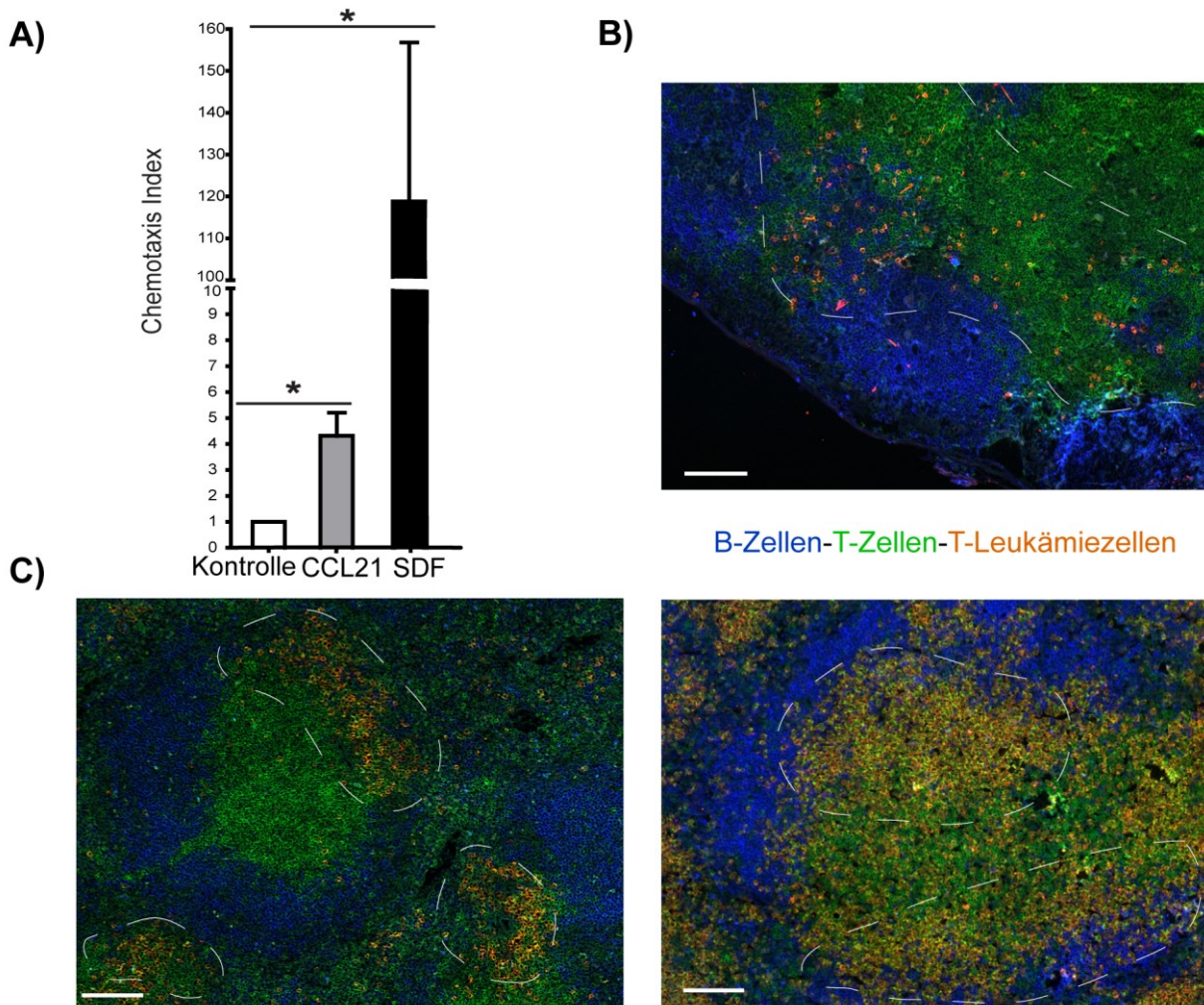
### 3.5. Die T-Leukämiezellen migrieren zur T-Zell-Zone von Lymphknoten und Milz

#### 3.5.1. T-Leukämiezellen zeigen *in vitro* funktionelle Chemokinrezeptoren

Nachdem mittels Durchflusszytometrie das Vorhandensein von CXCR4 und CCR7 auf der Oberfläche der T-Leukämiezellen bewiesen war (s. 3.4.1), galt es deren Funktionalität zu prüfen. Als *in vitro* Test diente ein Chemotaxis Assay. Dabei wurde die Fähigkeit der DP T-Leukämiezellen geprüft, auf einen Chemokinstimulus hin eine kollagenbeschichtete Filtermembran zu durchwandern. In 4 unabhängigen Experimenten konnte für einen T-Leukämiezellen Klon eine gerichtete Migration sowohl auf CXCL12/SDF (Ligand von CXCR4) als auch auf CCL21 (Ligand von CCR7) gezeigt werden (Abbildung 10A). Für zwei weitere Klone wurde ebenfalls eine Reaktion auf die Liganden gezeigt, jedoch ohne statistische Signifikanz, da für diese Klone der Versuch nur jeweils einmal durchgeführt wurde.

#### 3.5.2. *In-vivo* migrieren T-Leukämiezellen zur T-Zell-Zone von Milz und Lymphknoten und akkumulieren an der T:B Zonengrenze

Auf den *in vitro* Nachweis der Funktionalität der Chemokinrezeptoren, folgte die *in vivo* Analyse des Migrationsverhaltens der T-Leukämiezellen.



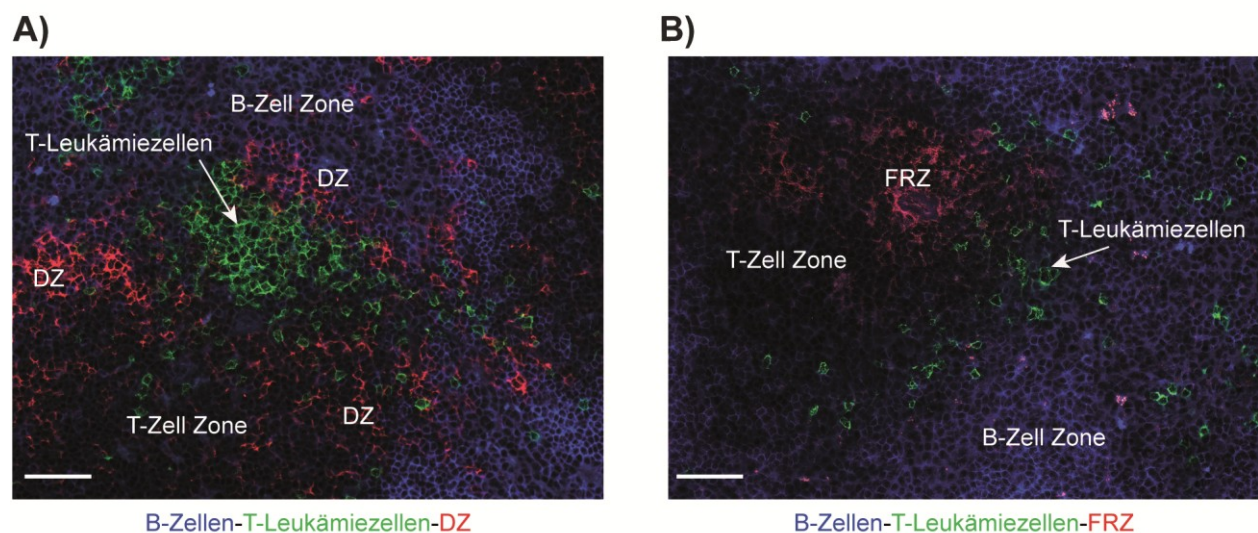
**Abbildung 10 T-Zell Migration in vitro und in vivo** **A)** In vitro Analyse der Migrationsfähigkeit mittels Chemotaxisassay. Die Balken repräsentieren das arithmetische Mittel des Chemotaxis Index aus n=4 unabhängigen Versuchen mit T-Zellen von Klon 1 mit Standardfehler (SEM), \* p<0.05 nach einfachem Anova-Test. **B)** und **C)** zeigen die in vivo Analyse der Migrationsfähigkeit. Transfer von  $8 \times 10^7$  T-Leukämiezellen aus immunkompetenten Mäusen (Klon 1) in n=2 12 Wochen alte B6 Ly5.1 Mäuse. Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von  $6\mu\text{m}$  Schnitten aus PFA fixierten Organen. **B)** 4 Tage nach adoptivem Transfer, Lymphknoten, 100x. **C)** Links Milz 1 Tag nach Transfer, 100x. Rechts Milz 4 Tage nach Transfer, 100x. blau = B220, grün = CD3, rot = CD45.2. Maßstabsleiste  $100\mu\text{m}$ .

Dazu wurden jeweils  $8 \times 10^7$  T-Leukämiezellen der Klone 1 und 2, welche ursprünglich aus der Milz isoliert wurden, i.v. in B6 Ly5.1 Mäuse transferiert. Nach 1 und 4 Tagen bzw. 1, 4 und 8 Tagen wurden die Mäuse abgetötet und die Lokalisation der injizierten T-Leukämiezellen mittels Immunhistologie bestimmt. Die T-Leukämiezellen konnten bei Klon 1 bereits nach 24 Stunden in der T-Zell-Zone von Milz und Lymphknoten nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich jedoch keine gleichmäßige Verteilung über die gesamte T-Zell-Zone, sondern eine Häufung an der Grenze zwischen T-Zell-Zone und der umgebenden B-Zell Zone im Lymphknoten (Abbildung



10B) und in der Milz (Abbildung 10C). Die Analyse von Klon 2 konnte die Migration der T-Leukämiezellen in die T-Zell-Zone von SLOs bestätigen. Zudem zeigte sich auch hier eine Häufung der T-Leukämiezellen an der T:B-Zonen Grenze. Jedoch zeigte sich hier eine verlangsamte Kinetik. In der Milz konnten erst am 4. Tag transferierten T-Zellen nachgewiesen werden.

Die Stromazellen der T-Zell-Zone, DZs und Fibroblastische Retikulumzellen (FRZs), lenken die Migration der T-Zellen und spielen in der Aktivierung von naiven T-Zellen eine wichtige Rolle.<sup>86-88</sup> Deshalb zeigen naive T-Zellen in gesunden Mäusen eine enge Interaktion mit Stromazellen. Möglicherweise lässt sich die Lokalisation der T-Leukämiezellen an der T:B-Zonengrenze ebenfalls auf eine Interaktion mit diesen Stromazellen zurückführen.



**Abbildung 11 Assoziation der T-Leukämiezellen mit Stromazellen der T-Zell-Zone** Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme von Milzschnitten 1 Tag nach Transfer von  $8 \times 10^7$  T-Leukämiezellen aus immunkompetenten Mäusen. Repräsentativ für  $n=12$  Wochen alte B6 Ly5.1 Maus. **A)** Milz, 200x Vergrößerung, blau=B220, grün=CD45.2., rot=CD11c. **B)** Milz, 200x Vergrößerung, blau=B220, grün=CD45.2, rot=gp38. Maßstabsleiste, 50 $\mu$ m.

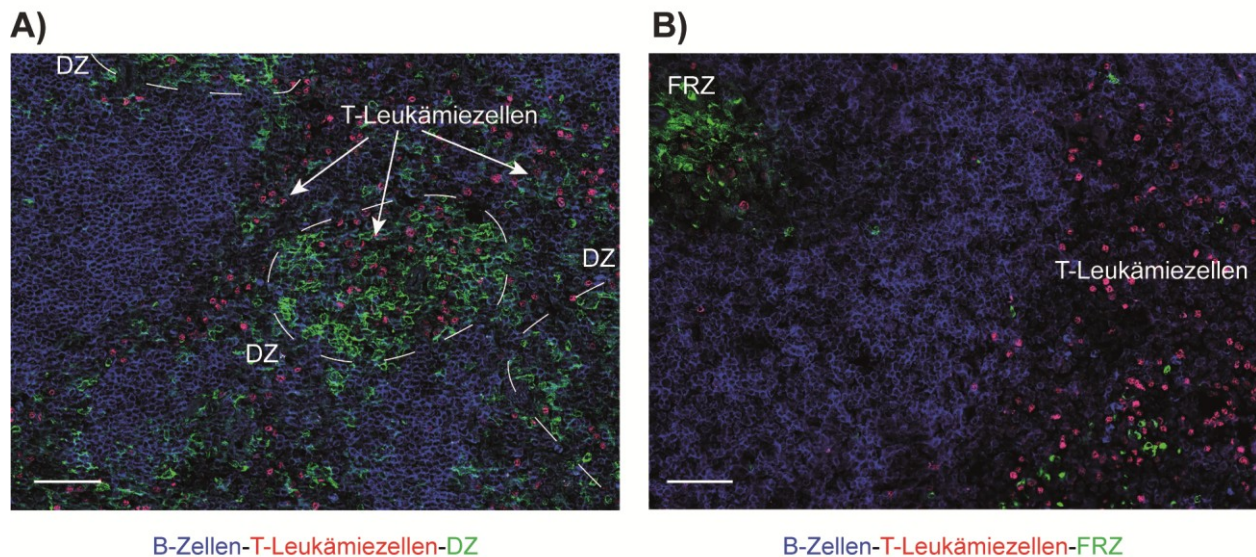
Mittels einer weiteren Färbung der oben verwendeten Schnitte konnte eine Kolokalisation der T-Leukämiezellen von Klon 1 mit DZs am Rand der T-Zell-Zone gezeigt werden (Abbildung 11A). Im Zentrum der T-Zell-Zone hingegen waren weniger transferierte T-Leukämiezellen zusammen mit den dort vorhandenen FRZs zu sehen (Abbildung 11B). Für die T-Leukämiezellen von Klon 2 konnte dieses Migrationsmuster ebenfalls gezeigt werden. Möglicherweise findet also am Rand der T-Zell-Zone vor allem eine Interaktion zwischen den transferierten T-Leukämiezellen und den DZs statt, welche die bevorzugte Lokalisation der T-Leukämiezellen an der T:B Zonengrenze erklären könnte.

### 3.5.3. Transfer in *plt/plt* Mäuse

Als nächstes sollte geprüft werden, welche Bedeutung die Kommunikation über den CCR7 Rezeptor für die Lokalisation der T-Leukämiezellen in den SLOs und deren Assoziation mit den Stromazellen der SLOs hat. Prinzipiell ergeben sich zwei Möglichkeiten zur Unterbindung der Kommunikation über den CCR7 Rezeptor. Zum Einen kann dies durch den Knock-Out des Rezeptors selbst erreicht werden und zum Anderen durch die Wegnahme der Liganden CCL19 und CCL21. Aus dem transgenen *CCR7*<sup>-/-</sup> Mausmodell war bereits bekannt, dass die Deletion des CCR7 Rezeptors zu einem Verlust der Architektur der T-Zell-Zone in SLOs führt. In einem adoptiven Transfermodell konnte weiterhin gezeigt werden, dass CCR7-defiziente Lymphozyten in Wildtyp Empfängertieren, die über eine intakte T-Zell-Zone verfügen, nicht mehr effektiv in die T-Zell-Zone der Milz einwandern können. Das Einwandern der CCR7-defizienten Lymphozyten über die HEVs in Lymphknoten, ist ohne Expression von CCR7 komplett blockiert.<sup>47</sup> Ein Knock-Out des CCR7 Rezeptors wäre im *Eμ-Tcl1/BCR*<sup>HEL</sup> Stamm sehr aufwendig zu generieren gewesen. Deshalb wurde stattdessen die Kommunikation über diesen Signalweg durch Wegnahme der Liganden unterbunden. Dazu wurde das *plt/plt* Mausmodell verwendet. Diesen transgenen Mäusen fehlen die Liganden für den CCR7 Rezeptor, CCL19 und CCL21, sodass dieser unstimuliert bleibt. So konnte dieser Kommunikationsweg auch ohne einen KO des CCR7 Rezeptors auf den *Eμ-Tcl1/BCR*<sup>HEL</sup> T-Leukämiezellen unterbunden werden. Es zeigte sich in diesem Transferversuch eine Migration von T-Leukämiezellen in SLOs. Die *plt/plt* Mäuse zeigen auf Grund des Mangels an CCL19 und CCL21 eine stark veränderte Architektur der SLOs ohne geordnete T-Zell-Zone. Die transferierten T-Leukämiezellen lagen in den *plt/plt* Mäusen über die gesamte rote Pulpa der Milz verstreut vor und zeigten eine Kolokalisation mit DZs (Abbildung 12A). Die klassische Anordnung von FRZs in Netzwerken ist in den Milzen der *plt/plt* Empfängertiere gestört und die T-Leukämiezellen zeigten nur eine schwache Kolokalisation mit den FRZs (Abbildung 12B). Zudem zeigt sich eine verlangsamte Migration von T-Leukämiezellen in die LNs.

Dort liegen sie verstreut über Mark und Randzone, jedoch ohne Kontakt zu B-Zellen. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass trotz der Inhibition der Kommunikation über den CCR7 Rezeptor eine Assoziation der T-Leukämiezellen mit DZs und weniger mit FRZs zu beobachten war.



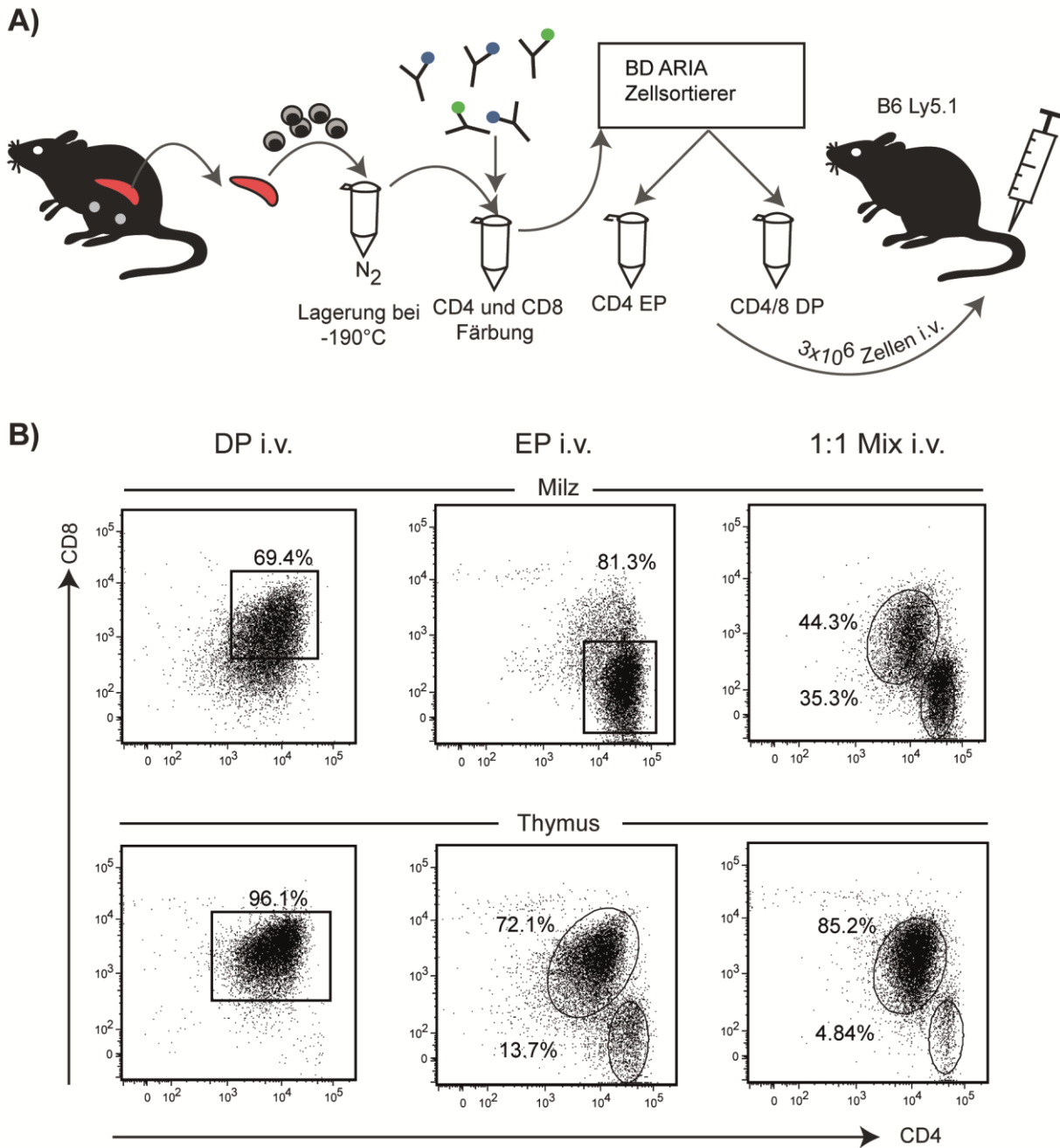


**Abbildung 12 T-Leukämiezellen sind in *plt/plt* Mäusen mit Dendritischen Zellen der Milz assoziiert**  
 Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme von Milzschnitten 8 Tage nach Transfer von  $1 \times 10^7$  T-Leukämiezellen aus immundefizienten Mäusen in 8 Wochen alte *plt/plt* Mäuse. Repräsentativ für  $n=2$  *plt/plt* Mäuse. **A)** Milz, 200x Vergrößerung (photomerge), blau=B220, rot=CD11c, grün=CD45.2. (Transferierte T-Leukämiezellen). **B)** Milz, 200x Vergrößerung, blau=B220, rot=CD45.2., grün=gp38. Maßstabsleiste, 50 $\mu$ m.

### 3.6. Der Thymus als möglicher Ursprungsort der T-Leukämiezellen

#### 3.6.1. Der Thymus unterstützt die Expansion von CD4/8 DP T-Leukämiezellen gegenüber CD4 EP T-Leukämiezellen

Die detaillierte Analyse sämtlicher *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Tiere mit T-Zell-Leukämie offenbarte neben der charakteristischen DP Tumorzellpopulation in manchen Tieren eine zweite CD4 EP T-Zellpopulation (s. 3.4.2). Welche Rolle diese CD4 EP T-Zellen im Krankheitsprozess spielen, blieb zunächst unklar. Klonalitätsanalysen hatten nahegelegt, dass es sich bei den CD4 EP T-Zellen möglicherweise auch um monoklonale T-Leukämiezellen handelte. Die Malignität dieser T-Zell Population sollte mit Hilfe eines Transferexperiments geprüft werden. Dazu wurden isolierte T-Leukämiezellen vom Klon 3 per FACS in eine CD4 EP und eine CD4/8 DP Population getrennt. Die Subpopulationen wurden dann getrennt in kongene immunkompetente B6 Ly5.1 Mäuse transferiert, um ihre Fähigkeit zur malignen Proliferation zu prüfen (Abbildung 13A). Nach 15 Tagen konnte sowohl für die EP als auch für die DP T-Leukämiezellen eine starke Proliferation in der Milz gezeigt werden. Wurden die beiden Populationen gemeinsam transferiert, so zeigten sich nach 15 Tagen Expansion in der Milz beide Populationen in etwa gleich groß (Abbildung 13B).



**Abbildung 13 Der Thymus zeigt einen hohen Anteil DP T-Leukämiezellen A)**  $1 \times 10^8$  Milzzellen von Klon 3 wurden aus der Flüssigstickstoff Lagerung aufgetaut und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für CD4 und CD8 gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden dann am FACS Gerät in eine CD4 EP und eine CD4/8 DP Population aufgeteilt.  $3 \times 10^6$  Zellen der jeweiligen Population wurden in 8 Wochen alte B6 Ly5.1 Mäuse injiziert ( $n=2$  pro Zellpopulation). Zudem wurden  $3 \times 10^6$  Zellen einer 1:1 Mischung beider Zellpopulationen in 6 Wochen alte Ly5.1 Mäuse injiziert ( $n=2$ ). **B)** Die Dotplots zeigen eine repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Bestimmung des Gehalts an EP und DP Zellen in Milz und Thymus 15 Tage nach Transfer.

Es ist also anzunehmen, dass es sich bei den EP T-Zellen ebenfalls um maligne T-Zellen handelt und dass diese in gleichem Maße wie DP T-Leukämiezellen zur malignen Proliferation in SLOs

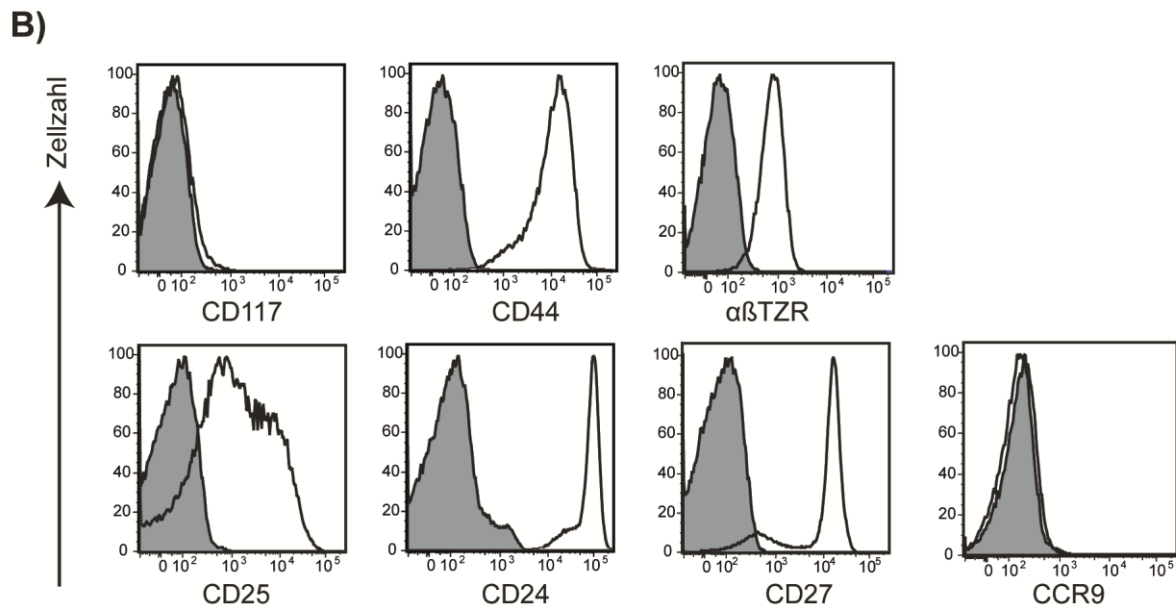
fähig sind. Auf Grund der Ähnlichkeit des DP Leukämie Phänotyps mit unreifen T-Zellvorstufen im Thymus wurde auch dort die Proliferation der transferierten T-Leukämiezellen analysiert. Im Thymus wiesen die Leukämiezellsubpopulationen, anders als in der Milz, ein deutlich unterschiedliches proliferatives Potential auf. Unabhängig davon, ob CD4 EP Leukämiezellen, CD4/8 DP-Leukämiezellen oder ein Mix aus beiden injiziert wurde, machten CD4/8 DP-Leukämiezellen am Ende des Beobachtungszeitraums den Großteil der T-Zell Population des Thymus aus (Abbildung 13B). Im Thymus scheinen also die injizierten CD4/8 DP-Leukämiezellen zu einem schnelleren Wachstum fähig zu sein als die CD4 EP Leukämiezellen. Dieses Transferexperiment zeigte, dass EP T-Leukämiezellen wie die DP T-Leukämiezellen ebenfalls das Potential zur malignen Proliferation in SLOs haben. Der höhere Anteil der DP-Leukämiezellen im Thymus deutet dabei auf eine mögliche Rolle der Thymus-Mikroumgebung in der Entstehung dieser Tumorzellpopulation hin.

### **3.6.2. DP T-Leukämiezellen tragen Marker verschiedener Thymozytenpopulationen**

Um die Vermutung zu prüfen, dass es sich beim Thymus um das Entstehungsorgan der DP Leukämiezellpopulation handelt, wurden die DP T-Leukämiezellen von Klon 1 und 2 auf eine Reihe von Markern hin geprüft, welche charakteristisch für unreife T-Zellen im Thymus sind. Gesunde DP T-Zellen stellen eine spätes Stadium der T-Zellentwicklung im Thymus dar (Abbildung 14A). Die DP T-Leukämiezellen von Klon 1 und 2 waren jedoch positiv für Marker früherer Entwicklungsstadien. Der  $CD24^+$ ,  $CD25^+$ ,  $CD27^+$ ,  $CD44^+$ ,  $CD117^-$  Phänotyp zeigt Charakteristika des DN2a und des DN3b Stadiums (Abbildung 14B/C). Die Positivität der Leukämiezellen für CCR9 ist typisch für das DP Stadium der T-Zellentwicklung, während die Positivität für den  $\alpha\beta$ -TZR eher typisch für den Übergang zur EP T-Zelle ist (s. 1.1.2).<sup>89</sup> Diese Tumorzellen tragen also sowohl Marker vom physiologischen Endstadium der T-Zellentwicklung als auch von früheren Vorstufen und lassen sich dadurch nicht klar zu einem Stadium der T-Zellentwicklung zuordnen. Dennoch bekräftigt die Vielzahl der vorhandenen Thymozytenmarker die Annahme, dass der Ursprung der DP T-Leukämiezellen im Thymus liegt.

**A)**

| ETP/DN1  | DN2a   | DN2b   | DN3a   | DN3b   | DN4a  | DP                      |
|--|--|--|--|--|---|-------------------------|
|  |  |  |  |  |   |                         |
| CD117hi<br>CD44hi<br>CD25-<br>CD24-/lo<br>CD27hi | CD117hi<br>CD44hi<br>CD25+<br>CD24hi<br>CD27hi | CD117int<br>CD44hi<br>CD25+<br>CD24hi<br>CD27int | CD117-/lo<br>CD44-/lo<br>CD25+<br>CD24hi<br>CD27-/lo | CD117-/lo<br>CD44-/lo<br>CD25int<br>CD24hi<br>CD27hi | CD117-/lo<br>CD44-/lo<br>CD25-/lo<br>CD24hi<br>CD27hi | CD4+<br>CD8+<br>TZRβint |



**Abbildung 14 Der Thymus als Entstehungsort der DP T-Leukämiezellen** **A)** Physiologische Stadien der T-Zellentwicklung mit ihren charakteristischen Oberflächenmarkern (abgeändert nach Koch und Radtke).<sup>4</sup> **B)** Die Histogramme zeigen die durchflusszytometrische Analyse verschiedener Oberflächenmarker, welche typisch für die T-Zellentwicklung sind. T-Leukämiezellen von Klon 1 nach Expansion in 17 Wochen alten Rag<sup>-/-</sup> Mäusen (n=4 Tiere). Die Daten sind repräsentativ für n=2 Klone. Grau schattierte Kurve = Isotyp.

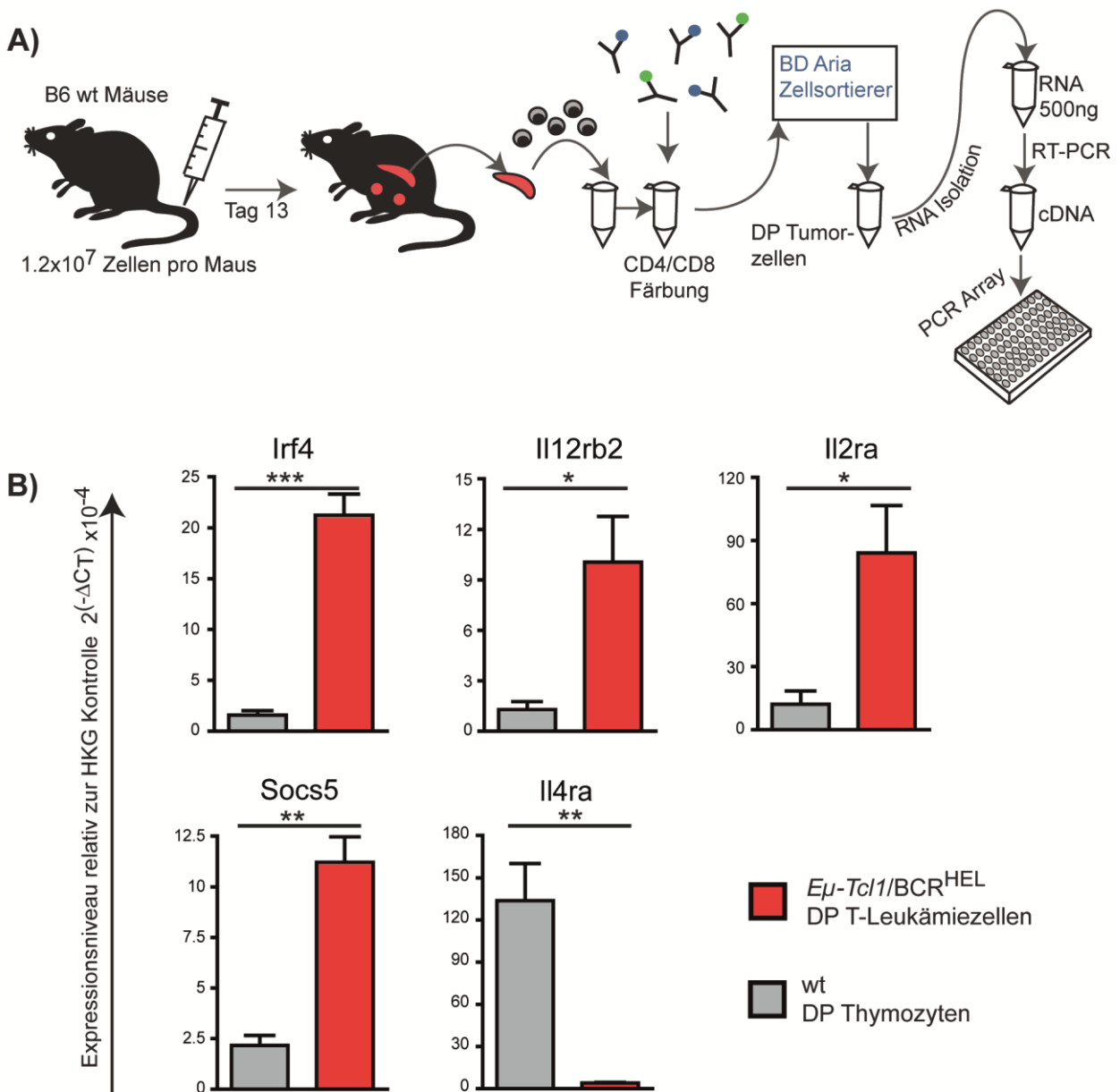
### 3.7. T-Leukämiezellen zeigen Charakteristika reifer T-Helferzellen und unreifer Thymozyten

Die oben beschriebenen Experimente deuten stark auf den Thymus als Entstehungsort der DP-Leukämiezellen hin. Da jedoch in der durchflusszytometrischen Analyse der Thymozytenmarker keine klare Zuordnung der T-Leukämiezellen zu einer Reifestufe möglich war, sollte durch weitere Durchflusszytometrie und Analysen auf RNA Ebene der Differenzierungsgrad der Leukämiezellen bestimmt werden. Bis zu diesem Punkt hatte sich die Analyse auf Marker der T-Zellentwicklung beschränkt. Nun wurde geprüft, ob die T-Leukämiezellen Marker noch

früherer hämatopoetischer Entwicklungsstufen trugen. Per Durchflusszytometrie wurden die T-Leukämiezellen von Klon 1 und 2 auf den Marker CD34 hin untersucht, welcher auf hämatopoetischen Stammzellen und multipotenten Progenitorzellen, den frühesten Vorstufen der T-Zellentwicklung, exprimiert wird.<sup>90</sup> Die Tumorzellen waren negativ für diesen Marker, was stammzellähnlichen Eigenschaften unwahrscheinlich macht. Als nächstes wurden Marker reifer T-Zellen geprüft. Alle untersuchten Klone waren positiv für den  $\alpha\beta$ -TZR, welcher erst nach dem Passieren des  $\beta$ -Selektionspunktes am Übergang zum DP Stadium der T-Zellentwicklung exprimiert wird. Trotz ihrer Positivität für Marker früher Entwicklungsstadien ist es den T-Leukämiezellen möglich, Oberflächenproteine reiferer Entwicklungsstufen zu exprimieren.

PCR Array Analysen sollten, durch die Expressionsanalyse typischer Gene reifer T-Zell Subtypen, eine breitere Analyse des Reifegrads ermöglichen. Dafür wurden T-Leukämiezellen aus der Milz von immunkompetenten Empfängertieren (s. 3.2.1) nach adoptivem Tumorzelltransfer gewonnen. Mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung (FACS) wurde die DP T-Leukämiezellpopulation aufgereinigt und die RNA isoliert. Als Kontrolle diente RNA aus DP Thymozyten. Nach der Umschreibung der RNA in cDNA wurden drei unabhängige Läufe mit dem RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array PAMM-503ZA von Qiagen durchgeführt (Abbildung 15A). Dieser Array gibt Aufschluss über die Expression von 84 Genen, welche den Grad der Differenzierung und Aktivierung von T-Zellen anzeigen. Die Leukämiezellen zeigten gegenüber den DP Thymozyten eine gesteigerte Expression von Genen, welche in der Differenzierung von Typ 1 T-Helferzellen (TH1) eine Rolle spielen (Abbildung 15B).

So ist zum Beispiel das Gen für den IL-12 Rezeptor stark exprimiert. Die Aktivierung von IL-12 stellt zusammen mit IFN- $\gamma$  das Startsignal für die TH1 Differenzierung dar und führt über die Aktivierung von STAT4 und T-BET zur gesteigerten Expression des IL-12 Rezeptors.<sup>35</sup> SOCS5, ein Inhibitor von Zytokinsignalen welcher die Differenzierung der Typ 2 T-Helferzellen (TH2) unterdrückt, ist ebenfalls stärker exprimiert.<sup>91</sup> Die Supprimierung der TH2 Differenzierung wird auch an der geringen Expression des IL-4 Rezeptors deutlich, welcher für die TH2 Entwicklung eine ebenso zentrale Rolle spielt wie der IL-12 Rezeptor für die TH1 Entwicklung.<sup>35</sup> Die erhöhte Expression von IRF4 deutet allgemein auf die Einleitung der TH-Zellentwicklung nach Stimulation des TZR hin.<sup>92</sup> Die Positivität für den IL-2 Rezeptor (CD25) spielt auch in diesem Kontext eine Rolle. Der Rezeptor wird nicht nur in frühen Stadien der T-Zellentwicklung exprimiert (Abbildung 14) sondern auch auf Antigen-aktivierten T-Zellen.<sup>93</sup> Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Leukämiezellen, unabhängig von ihrem putativen Ursprung im Thymus, Eigenschaften erlangt haben, welche über die der unreifen Vorläufer hinausgehen und der einer aktivierten TH1 Zelle ähneln.



**Abbildung 15 RT<sup>2</sup>-Profilier PCR Array zur T-Zell Differenzierung** **A)** T-Leukämiezellen von Klon 1 wurden aus der Milz von immunkompetenten Empfängertieren (n=3 8 Wochen B6 Mäusen) gewonnen. Die isolierten Zellen wurden mit immunfluoreszenzmarkierten Antikörpern für CD4 und CD8 gefärbt. Anschließend wurde die CD4/8 DP Leukämiezellpopulation per FACS isoliert. Aus den Leukämiezellen wurde RNA gewonnen, welche nach der Umschreibung in cDNA zur Durchführung von n=3 PCR Arrays verwendet wurde. **B)** Genexpression auf RNA Ebene relativ zur HKG Kontrolle. RNA von DP Thymozyten aus B6 Mäusen diente als Kontrolle. Die Balken zeigen das arithmetische Mittel mit Standardfehler (SEM) repräsentativ für n=3 unabhängige Experimente. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 nach ungepaartem t-Test.

### 3.8. RNA Analysen zeigen keine Stimulation des PI3K-Akt Signalwegs

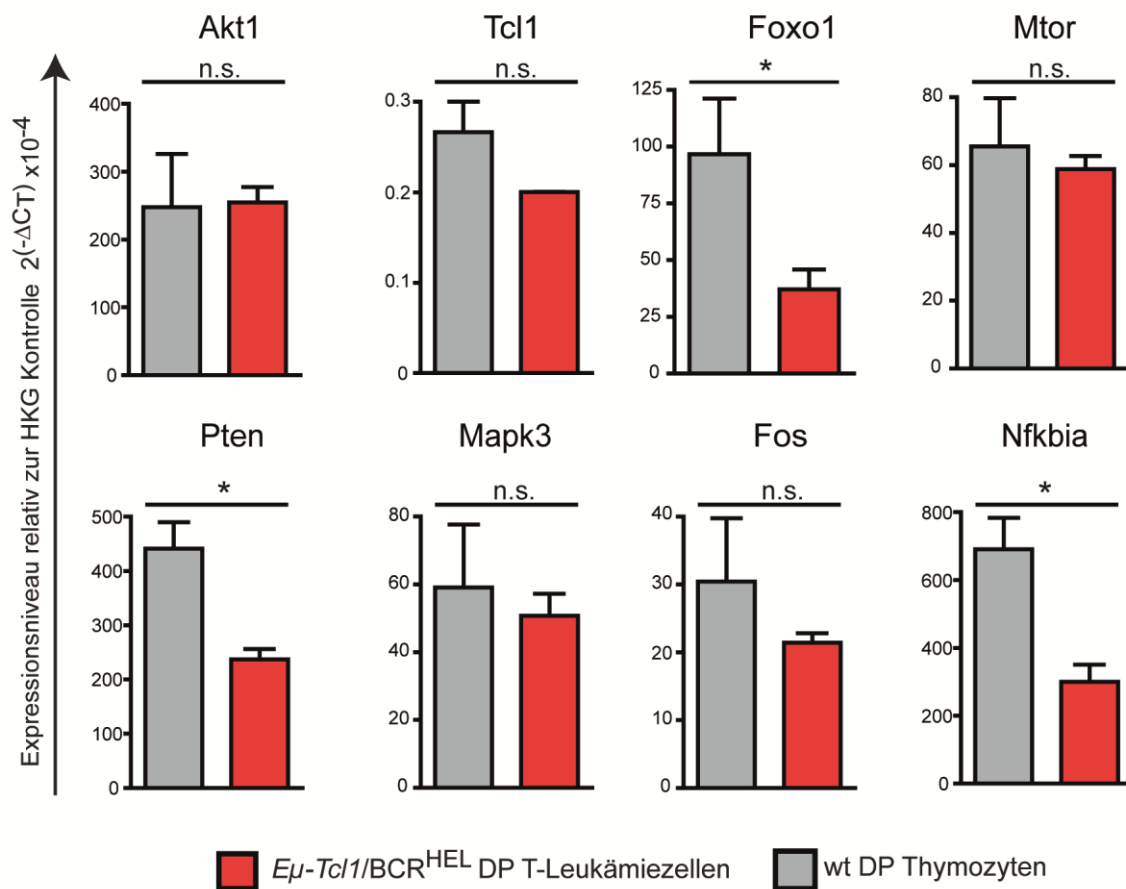
Durchflusszytometrische Analysen hatten gezeigt, dass sowohl im *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamm als auch im *Eμ-Tcl1* Stamm T-Zellen in der Lage sind TCL1 zu exprimieren. Mittels RT-PCR Array sollte untersucht werden, welchen Effekt die *Tcl1*-Expression auf die Signalwege der T-Leukämiezellen hat. Dazu wurden, analog zu 3.7., DP T-Leukämiezellen und DP Thymozyten als Kontrolle per FACS aufgereinigt. Nach der Isolierung der RNA und der Umschreibung in cDNA wurde in drei unabhängigen Experimenten der RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array für den PI3K-Akt Signalweg von Qiagen durchgeführt (PAMM-058ZA). Dieser Signalweg ist physiologisch verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen nachgeschaltet, unter anderem auch dem T-Zell Rezeptor.<sup>39,42</sup> Es ist bekannt, dass TCL1 über Aktivierung von AKT stimulierend in diesen Signalweg eingreift.<sup>39,43</sup> Eine unkontrollierte Expression von TCL1 kann über AKT1 die maligne Transformation von Lymphozyten bewirken (s. 1.3.2). T-Leukämiezellen zeigten im Vergleich zu DP Thymozyten, welche zu den Zellpopulationen gehören, die physiologisch TCL1 exprimieren, keine signifikante Steigerung der TCL1 oder AKT Expression (Abbildung 16).<sup>38</sup> Die Expression typischer Mediatoren der AKT1 Funktion, wie z.B. MTOR (Abbildung 3), zeigte sich nicht signifikant verändert. Die Expression des Transkriptionsfaktors FOXO1, welcher auf Proteinebene von AKT1 gehemmt wird, war erniedrigt.<sup>94</sup> Die Expression der Phosphatase PTEN, welche eine Hemmung von AKT bewirkt, zeigte sich ebenfalls erniedrigt.<sup>95</sup> Die erniedrigte Expression von FOXO1 und PTEN könnte möglicherweise mit einer erhöhten Aktivität im PI3K-Akt Signalweg einhergehen. Dennoch spricht die unveränderte Expression von AKT selbst, sowie vieler der im Array geprüften Mediatoren wie BAD, CASP9, TSC1 und TSC2, gegen eine erhöhte Aktivität des Signalwegs auf genomischer Ebene. Eine unphysiologisch hohe Expression von AKT und seinen Mediatoren kann auch mit der erhöhten Expression anderer Signalwege verbunden sein. So bestehen indirekte Verbindungen zum MAP-Kinase/Erk Signalweg.<sup>96</sup> Für MAPK3 und FOS aus dem MAPK/Erk Signalweg konnte keine signifikante Veränderung der Expression gezeigt werden. Zudem ist bekannt, dass TCL1 auch stimulierend in den NF-κB Signalweg eingreifen kann (s. 1.3.2). Dieser Effekt konnte hier auf genomischer Ebene nicht nachgewiesen werden, es zeigte sich eine erniedrigte Expression von NF-κB.

Im Vergleich zu DP Thymozyten liegen insgesamt nur wenige Veränderungen der Expression von Genen aus dem PI3K-Akt Signalweg in DP T-Leukämiezellen vor. Es muss von einem unveränderten Expressionsniveau des PI3K-Akt Signalwegs im Vergleich zu DP Thymozyten ausgegangen werden. Dies legt nahe, dass TCL1 anders als in der Entstehung der B-CLL im *Eμ-*



## Ergebnisse

*Tcl1* Mausstamm im *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamm eine untergeordnete Rolle in der Entartung der T-Zellen spielt.



**Abbildung 16** RT<sup>2</sup>-Profiler PCR Array des PI3K-Akt Signalwegs T-Leukämiezellen von Klon 1 wurden aus der Milz von immunkompetenten Empfängertieren (n=3 8 Wochen B6 Mäusen) gewonnen. DP-Leukämiezellen wurden per FACS isoliert. 1µg RNA wurde in cDNA umgewandelt und für 3 Array Läufe pro Klon eingesetzt. Die Höhe der Genexpression wird hier als relatives Maß der Veränderung gegenüber der HKG Kontrolle dargestellt. RNA aus DP Thymozyten diente als Kontrolle. Die Balken zeigen das arithmetische Mittel mit Standardfehler (SEM) von 3 unabhängigen Experimenten. n.s. nicht signifikant; \* p<0.05 nach ungepaartem t-Test.

### 3.9. DP T-Leukämiezellen zeigen eine Fehlregulation des Notch Signalweges

#### 3.9.1. Im RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array zeigt sich eine Aktivierung des Notch Signalweges

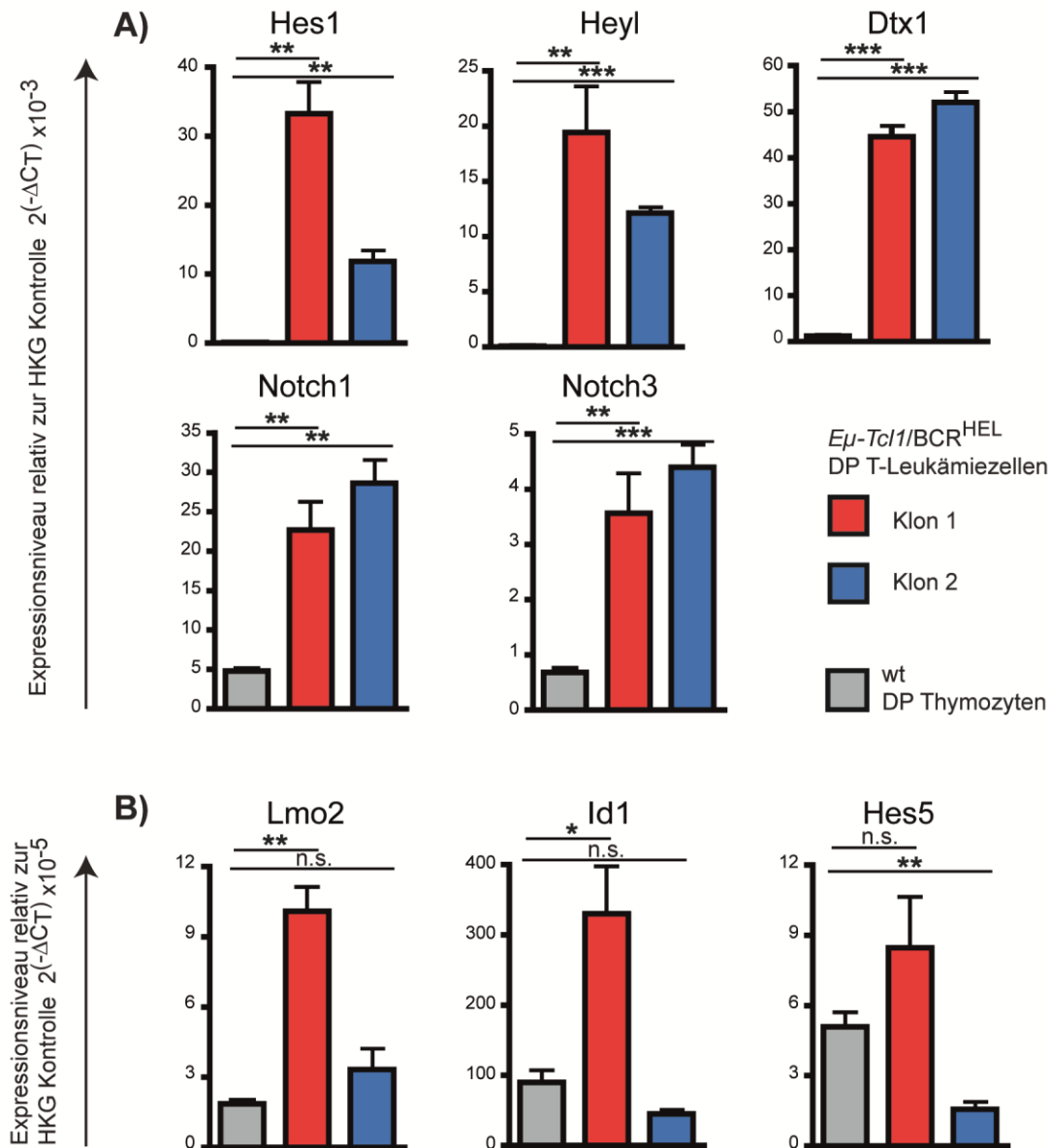
Sollte das TCL1 Signal tatsächlich nur eine geringe onkogene Wirkung auf die T-Zellen ausüben, so müssen weitere Faktoren für die Entartung der T-Zellen verantwortlich sein. Eine potentielle Ursache ist eine Fehlregulation des Notch Signalweges (s. 1.3.1). NOTCH 1-4 gehören zu einer Familie von Transmembranrezeptoren. Im aktivierten Zustand nehmen sie mit ihrer intrazellulären Domäne (ICN) als Transkriptionsfaktoren regulatorischen Einfluss auf die Entwicklung von Herz, Leber, Niere und weitere Organsysteme.<sup>27,28</sup> Besonders interessant für



diese Arbeit ist die Rolle von NOTCH1 als zentraler Regulator der T-Zellentwicklung.<sup>4</sup> Notch Mutationen wurden bereits in hämatologischen Tumoren wie auch in soliden Tumoren nachgewiesen.<sup>29,97,98</sup>

Ähnlich wie bei der Analyse der TH-Zell Differenzierung (s. 3.7) wurden PCR Arrays durchgeführt, um eine Veränderung im Notch Signalweg nachzuweisen. Dazu wurden T-Leukämiezellen von Klon 1 und Klon 2 aus den Milzen von immunkompetenten Empfängertieren gewonnen und per FACS die DP Leukämiezellpopulation isoliert. Nach der Isolierung der RNA und der Umschreibung in cDNA wurden für jeden Klon drei unabhängige Läufe des PCR Arrays für den Notch Signalweg durchgeführt (Qiagen PAMM-059ZA). Als Kontrolle wurde abermals RNA aus DP wt Thymozyten verwendet. Mit dem PCR Array konnte für beide Klone eine Erhöhung der Expression gezeigt werden. Zusätzlich zu NOTCH1 und NOTCH3 konnte auch eine stark erhöhte Expression von Notch Zielgenen gezeigt werden (Abbildung 17A). Die Gene *hes1*, *hey1* und *dtx1* werden direkt über NOTCH1 gesteuert und stellen klassische Indikatoren der Notch Aktivität dar. Zudem spielen HES1 und DTX1 eine wichtige Rolle als Effektoren der NOTCH1 vermittelten Kontrolle der T-Zellentwicklung.<sup>69,99-102</sup> Ihre erhöhte Expression dient also nicht nur als Signal für die Dysregulation des Notch Signalwegs im Allgemeinen, sondern lässt eine Beteiligung dieses Signalwegs an der Entartung von T-Zellen im Rahmen der T-Zellentwicklung vermuten. Eine Fehlregulation der frühen T-Zellentwicklung, möglicherweise ausgelöst durch eine Mutation des *notch1* Gens, könnte die Entartung von unreifen T-Zellen im Thymus fördern und damit auch den Phänotyp der T-Zell-Leukämie erklären. Die Bedeutung der beschriebenen Gene für den Phänotyp der Leukämiezellen wird zudem dadurch unterstrichen, dass nicht alle Gene so homogen in beiden Klonen hochreguliert sind.

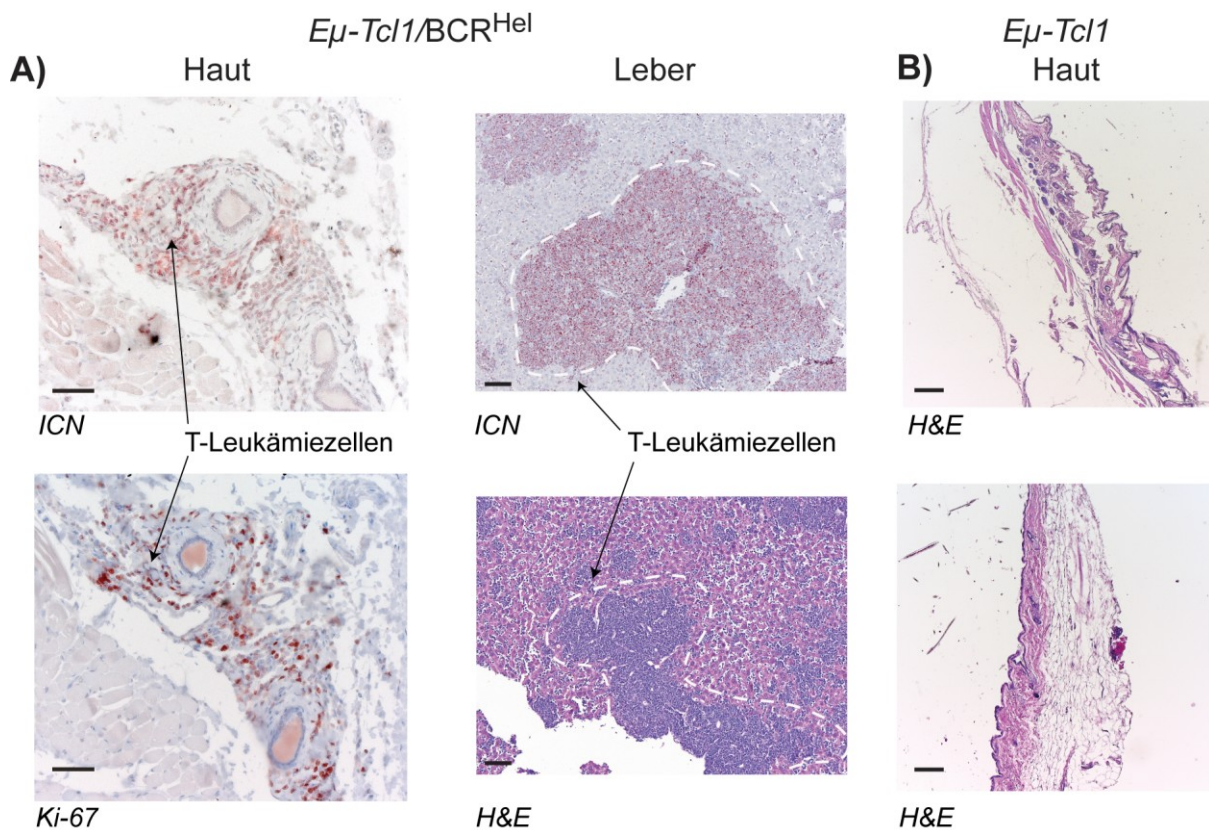
Der Transkriptionsfaktor LMO2 hat ähnlich wie HES1 eine hemmende Wirkung auf die T-Zell Differenzierung und könnte somit ebenfalls den Leukämiezellphänotyp erklären.<sup>103</sup> Klon 2 scheint diesen Faktor jedoch wesentlich weniger stark zu exprimieren als Klon 1 (Abbildung 17B). Dennoch haben beide den DP, unreifen Phänotyp. Die HLH Proteine ID1 und HES5 sind ebenfalls in der Lage die T-Zellreifung zu unterbrechen und können damit einen unreifen T-Zellphänotyp herbeiführen.<sup>100,104</sup> Doch auch hier besteht keine Kongruenz der Expression zwischen Klon 1 und Klon 2. Offensichtlich sind die Leukämie Klone nicht identisch in ihrem Expressionsmuster, was möglicherweise auch ihr ungleiches Wachstumsverhalten erklären könnte (s. 3.5.2). Im Hinblick auf diese Unterschiede scheinen die Gemeinsamkeiten in der Genexpression jedoch umso bedeutsamer für die Erklärung des gemeinsamen, unreifen DP Phänotyps.



**Abbildung 17** RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array für den Notch Signalweg T-Leukämiezellen von Klon 1 und 2 wurden nach adoptivem Transfer aus immunkompetenten Empfängermäusen (Klon 1 n=3 8 Wochen alt; Klon 2 n=5 7 Wochen alt) gewonnen und die DP-Leukämiezellen per FACS isoliert. 1µg RNA wurde in cDNA umgewandelt und für n=3 Array Läufe pro Klon eingesetzt. Die Höhe der Genexpression wird hier als relatives Maß der Veränderung gegenüber der HKG Kontrolle dargestellt. RNA aus DP Thymozyten diente als Kontrolle. Die Balken zeigen das arithmetische Mittel mit Standardfehler (SEM) von n=3 unabhängigen Experimenten. n.s. nicht signifikant, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 nach ungepaartem t-Test. **A)** Beide Klone zeigen ähnliche Veränderungen in der Expression von vielen Notch Zielgenen. **B)** Die zwei Klone unterscheiden sich in der Expression von bestimmten Notch Zielgenen.

### 3.9.2. T-Leukämiezellen zeigen verstärkte immunhistochemische Färbung für die intrazelluläre Domäne von NOTCH1 (NIZD1)

Die Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene offenbarte eine potentielle Rolle von NOTCH1 in der Krankheitsentstehung. Die erhöhte Expression von NOTCH1 sollte zur Bekräftigung dieser Hypothese mit einer zweiten Methode nachgewiesen werden. Die Immunhistochemie bot eine schnelle und einfache Möglichkeit NOTCH1 auf Proteinebene nachzuweisen.



**Abbildung 18 Immunhistochemie Klon 3** Lichtmikroskopische Aufnahmen von PFA fixierten 6μm Paraffinschnitten aus *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus mit T-Zell-Leukämie. Färbung für IZN1 mit Val1744 Antikörper. Die gefärbten Schnitte werden mit einem roten Farbstoff (AEC Chromogen) entwickelt. **A)** 6μm Schnitte der Haut und Leber Oben: IZN1 Färbung, Unten: Ki-67 Färbung (Ki-67 pos. Zellen in rot) bzw. H&E. 200x Maßstabsleiste 50μm. **B)** 6μm Schnitte der Haut zweier *Eμ-Tcl1* Mäuse mit B-CLL, H&E, 50x, Maßstabsleiste 200μm.

Zudem konnte durch die Färbung für NIZD1 statt des gesamten NOTCH1 das eigentliche Signalmolekül nachgewiesen werden. Das mehrmals gekürzte NIZD1 entsteht erst durch Prozessierung nach der Aktivierung von NOTCH1 (Abbildung 2). Da diese Prozessierung jedoch auf Proteinebene stattfindet, wird das gekürzte Produkt im RNA-Array nicht gesondert erfasst. Für diese Arbeit wurde zur Färbung ein Antikörper verwendet, welcher auch im Menschen zur Einschätzung der NIZD1 Aktivität verwendet wird.<sup>98</sup> Hier wurden die von T-Zell-Leukämie befallenen Organe erkrankter *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäuse gefärbt. Die T-Leukämiezellen

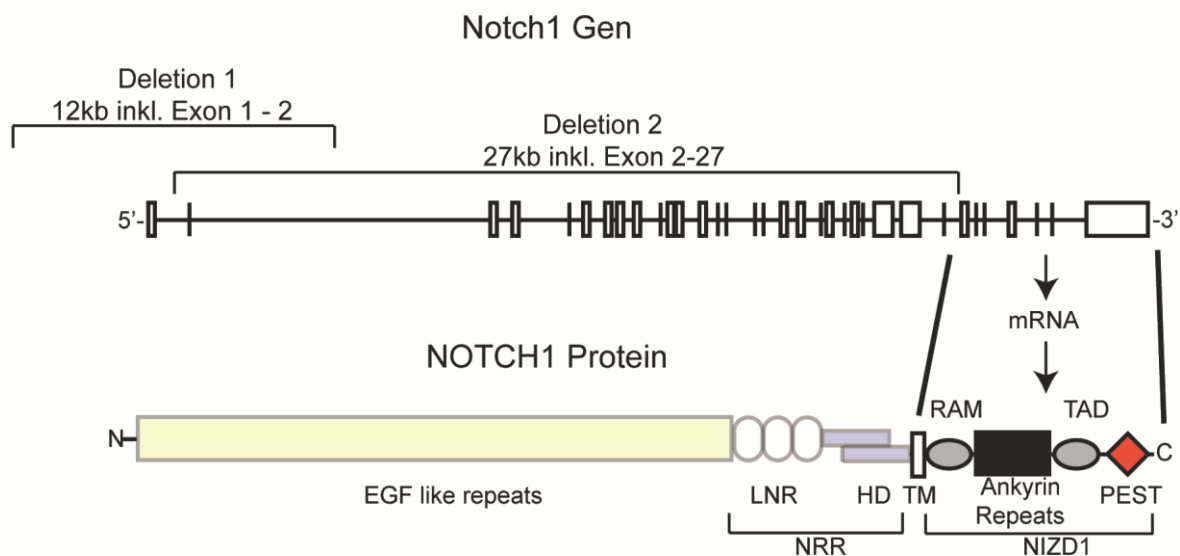
## Ergebnisse

zeigten sich deutlich positiv für IZN1. Die Färbung erwies sich als spezifisch, wie durch den Vergleich mit der Ki-67 und HE-Färbung deutlich wird (Abbildung 18A). Damit ist die erhöhte Expression von NOTCH1 auch auf der Protein Ebene gezeigt. Zudem macht diese Analyse deutlich, dass nicht nur NOTCH1 insgesamt, sondern auch der eigentliche Transkriptionsfaktor IZN1, stark durch die Leukämiezellen exprimiert wird.

Der hier gezeigte Hautbefall in *Eμ-Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mäusen mit T-Zell-Leukämie ist als Charakteristikum humaner T-Zell-Leukämien besonders hervorzuheben. Ein vergleichbarer Hautbefall konnte in *Eμ-Tcl1* Mäusen mit B-CLL nicht nachgewiesen werden (Abbildung 18B).

### 3.9.3. Typ 1 und Typ 2 Deletionen des *notch1* Gens liegen in T-Leukämiezellen nicht vor

Sowohl RNA Analysen als auch immunhistochemische Färbungen legen eine Fehlregulation des Notch Signalwegs nahe. Eine denkbare Erklärung für diese Fehlregulation sind Mutationen im *notch1* Gen. Solche Mutationen können in vielen murinen T-ALL Modellen nachgewiesen werden. Dabei sind analog zu humaner T-ALL (s. 1.2.4) am häufigsten Mutationen der PEST Region zu finden.

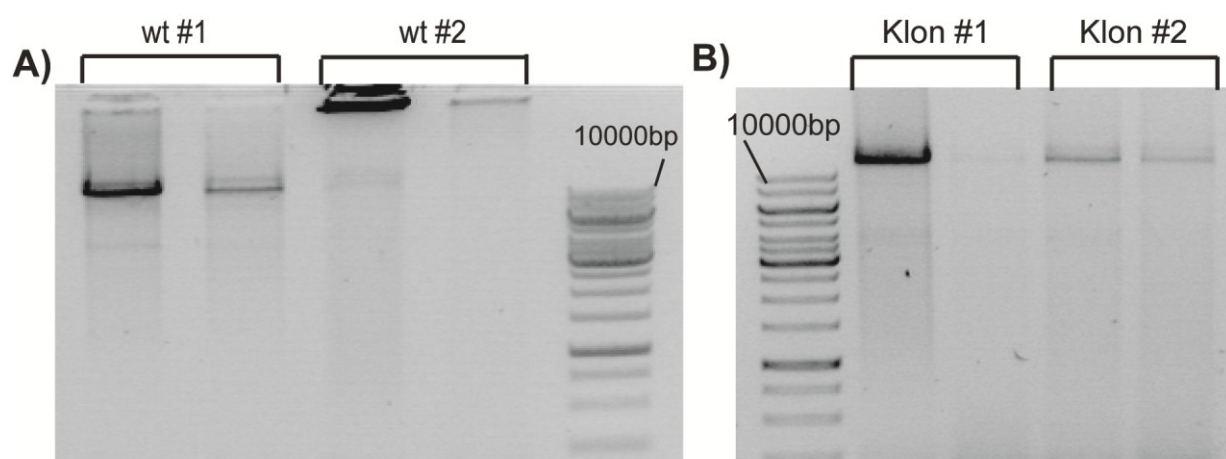


**Abbildung 19** *notch1* Gen mit Typ 1 und Typ 2 Deletion Lokalisation und funktionale Konsequenz von Typ 1 und 2 Deletionen des *notch1* Gens. Beide Deletionen führen zur dauerhaften Aktivierung von NOTCH1 durch alleinige Expression von NIZD1. LNR=Lin-12/Notch Repeat; HD= Heterodimerisations Domäne; NRR=negative regulatorische Region; TM=Trans-Membran Domäne; RAM=RBP-Jkappa assoziiertes Modul; TAD=transaktivierende Domäne; PEST=Degron Domain mit spezifischer Aminosäuresequenz (P-E-S-T). Modifiziert nach Aster et al.<sup>83</sup>

Wesentlich potenter sind jedoch in der Maus Typ 1 und Typ 2 Deletionen, da diese zur ligandenunabhängigen Expression von NIZD1 führen (Abbildung 19).<sup>83,97</sup> Beide Deletionen

führen zu einer Begrenzung der Proteinbiosynthese auf den NIZD1 Teil des NOTCH1 Proteins. Der Rezeptoranteil fehlt vollständig. Diese Mutationen können mit Hilfe einer PCR nachgewiesen werden. Dafür werden Primer verwendet, welche die Deletionen auf genomischer DNA Ebene (Deletion 1) bzw. auf cDNA Ebene (Deletion 2) einrahmen. Hat eine Deletion stattgefunden, so ist dies nach der PCR als stark verkürzte Bande in einer Gelelektrophorese sichtbar.

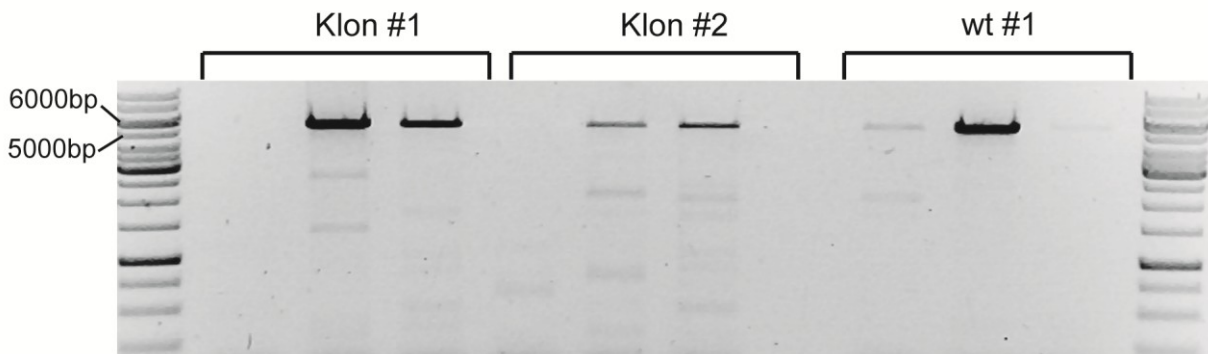
Mittels FACS wurden DP-Leukämiezellen von 2 T-Zell-Leukämie Klonen sowie DP Thymozyten als Kontrolle aufgereinigt, um anschließend aus diesen Zellen DNA zu isolieren. Die mit diesen Proben durchgeführte PCR konnte keine Deletion vom Typ 1 zeigen. Beide Proben mit Leukämie DNA zeigten wt Amplifikate von 12kb Länge (Abbildung 20). Die als selten beschriebene Typ 2 Deletion konnte hier in beiden Fällen ebenfalls nicht nachgewiesen werden.<sup>97</sup> Bei der PCR für die Typ 2 Deletion wurde RNA aus den per FACS aufgereinigten Zellen erst in cDNA umgeschrieben und dann analysiert. Beide Klone zeigten Banden von etwa 5kb (Abbildung 21). Dies entspricht dem Ergebnis der wt Kontrolle und der vorhergesagten Länge des Transkripts ohne Deletion. Die hohe Aktivität des Notch Signalwegs, welche in RT-PCR Analysen gezeigt wurde, geht also nicht auf Deletionen von Typ 1 oder 2 zurück. Möglicherweise sind weniger typische Genveränderungen im Notch Signalweg oder eine veränderte Regulation des Notch Signalwegs durch andere Signalwege ursächlich für die hohe Aktivität.



**Abbildung 20 PCR Screening für Notch Deletion Typ 1** UV-Licht Bild der Gelelektrophorese nach PCR mit dem Primerpaar Del1F/Del1R zur Detektion der Typ 1 Deletion.. **A)** Analyse von wt DNA isoliert aus DP Thymozyten von 8 Wochen alten B6/Ly5.1 Mäusen (n=3). **B)** Analyse von 2 Leukämie Klonen, DNA isoliert aus DP-Leukämiezellen nach adoptivem Transfer in 12 Wochen alte B6/Ly5.1 Mäuse.

## Ergebnisse

---



**Abbildung 21 PCR-Screening für Notch Deletion Typ 2** UV-Licht Bild der Gelelektrophorese nach PCR zur Detektion der Typ 2 Deletion. Analyse von DNA aus n=2 Klonen mit dem Primerpaar Del2F/Del2R. cDNA von 2 T-Leukämieklonen isoliert aus DP-Leukämiezellen nach adoptivem Transfer in 10 Wochen alte B6/Ly5.1 Mäuse. wt cDNA aus DP Thymozyten von n=2 10w alten B6 Mäusen. In der jeweils ersten Spur jeder Probe wurde nur die halbe cDNA Menge eingesetzt.

---

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zum mechanistischen Verständnis der Entwicklung von T-Zell-Leukämien zu leisten. Die Eigenschaften maligner Zellen im Allgemeinen sind gut bekannt. Maligne Zellen unterscheiden sich grundsätzlich von gesunden Zellen, etwa durch ihre Fähigkeit zu unbegrenzter Zellteilung oder durch ihre Unempfindlichkeit gegenüber Apoptose-Signalen.<sup>105</sup> Da sie aus den gesunden Zellen eines Organismus entstehen, sind sie zum Erlangen dieser Eigenschaften jedoch an das Abwandeln physiologischer zellulärer Mechanismen gebunden. Auf Grund der Diversität der gesunden Zellen aus denen maligne Zellen entstehen, existieren im Detail eine Vielzahl von Mechanismen, die es malignen Zellen ermöglichen, ihre einzigartigen Fähigkeiten zu erlangen und zu erhalten. So sind besonders für seltenere Tumorerkrankungen wie die T-Zell-Leukämien weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der genauen Mechanismen der Onkogenese nötig. In dieser Arbeit sollten diese Mechanismen am Beispiel der spontan entstandenen T-Zell-Leukämie der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus auf zwei verschiedenen Ebenen untersucht werden. Zum Einen sollte durch die detaillierte Analyse der malignen T-Zellen geprüft werden, inwiefern physiologische Mechanismen wie etwa die Reifung und Proliferation im Rahmen der T-Zellentwicklung in abgewandelter Form in den Dienst der Onkogenese gestellt werden. Zunächst sollte die Identität und der Ursprung der malignen T-Zellen etabliert werden. Nach der Klärung des Ursprungs der T-Zell-Leukämie sollte untersucht werden, welche abgewandelten physiologischen Mechanismen zur Transformation und Expansion dieser lymphoiden Zellen beigetragen hatten. Dabei sollten Parallelen zu bekannten Mechanismen aus humanen T-Zell-Leukämien gezogen werden. Zum Anderen sollte die Frage diskutiert werden, was das präferentielle Entstehen von T-Zell-Leukämien in der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus begünstigt. Als Ergebnis der beiden Ansätze lässt sich möglicherweise eine Hypothese über die Entstehung dieser murinen T-Zell-Leukämie formulieren, welche neben dem Beitrag zum Verständnis der Onkogenese in der transgenen *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus auch einen weiteren Beitrag zum mechanistischen Verständnis von humanen T-Zell-Leukämien leisten kann.

### 4.1. Identität der T-Zell-Leukämie

Ein erster wichtiger Schritt in der Aufklärung der spontan entstandenen T-Zell-Leukämie war die Aufklärung der Identität der malignitätsverdächtigen T-Zellen. Zunächst musste bewiesen werden, dass es sich bei den proliferierenden T-Zellen tatsächlich um maligne T-Zellen handelt. Im Anschluss wurde der Phänotyp der malignen T-Zellen charakterisiert. Maligne Zellen stellen

immer eine mehr oder weniger starke Abänderung einer gesunden Zelle dar, weshalb sich der Phänotyp der entarteten T-Zellen gut durch ihre Parallelen zu gesunden T-Zellen beschreiben lässt. Des Weiteren können Parallelen zu humanen Erkrankungen gezogen werden, die es erlauben, Erkenntnisse von der Maus auf den Menschen zu übertragen.

### 4.1.1. Malignität

Das regelmäßige Auftreten eines massiv erhöhten Anteils von CD5<sup>+</sup> lymphozytären Zellen in den Tieren des *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamms allein war noch kein Beweis dafür, dass eine maligne Transformation dieser Zellen vorlag. Ob es sich hierbei lediglich um eine benigne Expansion oder um eine maligne Erkrankung handelte, wurde mit Hilfe von adoptiven Zelltransferversuchen untersucht. Eine maligne Transformation liegt vor, wenn es zu einem Übergang von einem normalen, kontrollierten Zellwachstum zu unkontrolliertem Zellwachstum kommt. Zunächst konnte gezeigt werden, dass splenische CD5<sup>+</sup> lymphozytäre Zellen aus den *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Tieren zu einer massiven Proliferation und Expansion in immundefizienten Mäusen, die einen Entwicklungsdefekt für reife benigne T- und B-Lymphozyten aufweisen, fähig waren. Dies war bereits ein erster Anhalt für ein unkontrolliertes Wachstum, stellte jedoch noch keinen endgültigen Beweis dar und wurde in erster Linie zur Vermehrung dieser Zellen genutzt. Die Abwesenheit von Lymphozyten in immundefizienten Empfängertieren ermöglicht nämlich auch gesunden Lymphozyten die konkurrenzlose Proliferation, zumindest bis zur Erschöpfung der Wachstumsfaktoren in ihrer unmittelbaren Umgebung. Maligne Lymphozyten hingegen sind auch in Mäusen mit eigenen Lymphozyten zur unkontrollierten Expansion fähig. Einen weiteren Nachweis der Malignität von Zellen stellt daher der adoptive Zelltransfer in immunkompetente Mäuse dar. Deshalb wurden, nach Expansion in den immundefizienten Mäusen, anschließend die malignitätsverdächtigen T-Zellen in immunkompetente Mäuse transferiert. Die übertragenen Zellen expandierten massiv in den SLOs, dem Knochenmark, im Thymus und im peripheren Blut der Empfängertiere. Dieses unkontrollierte Wachstumsmuster ließ darauf schließen, dass es sich bei den massiv vermehrten CD5<sup>+</sup> lymphozytären Zellen in der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus um eine maligne T-Zell-Leukämie handelte.

Neben dem Beweis der Malignität wurde auch geprüft, ob es sich bei der Erkrankung um eine monoklonale T-Zell Proliferation handelte. Die Monoklonalität einer T-Zellpopulation ist gleichbedeutend mit der Reduzierung der TZR Diversität auf einen einzigen Phänotyp. Diese Einschränkung kommt durch die Verdrängung sämtlicher gesunder T-Zellen durch die identischen Nachkommen einer malignen T-Zelle zustande. In der Diagnostik humaner T-Zell-Leukämien wird die Monoklonalität einer T-Zellpopulation als Indikator ihrer Malignität



verwendet.<sup>106</sup> Als Maß für die Klonalität der T-Zell Proliferation wurden die T-Leukämiezellen der erkrankten *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäuse in einem standardisierten durchflusszytometrischen Assay auf das Vorhandensein bestimmter Subtypen der Vβ-Kette des TZR geprüft. Konnte auf sämtlichen T-Leukämiezellen einer erkrankten Maus der gleiche Vβ Subtyp nachgewiesen werden, so musste es sich hier um eine monoklonale Proliferation handeln, in der alle T-Leukämiezellen den gleichen Ursprung hatten.<sup>107</sup> Für zwei von sieben *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäusen konnte die Monoklonalität der T-Leukämiezellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Klonalitätsuntersuchung unterstreichen damit die Erkenntnis aus den Transferexperimenten, dass es sich bei dieser T-Zell Expansion um einen malignen Prozess handelt. Die T-Leukämiezellen zweier weiterer *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäuse zeigten keine klare Positivität für eine der untersuchten Vβ-Ketten. Eine weitere Maus zeigte eine ungewöhnliche Biklonalität. Dies lässt zwei gleichwertige Tumorzellpopulationen vermuten, die jeweils monoklonal sind und nebeneinander in einer Maus existieren. Die malignen T-Zellen der verschiedenen *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* zeigen also unterschiedliche Klonalitätsmuster.

#### 4.1.2. Der Phänotyp der T-Leukämiezellen im Vergleich zu gesunden T-Zellen

Unreife und reife T-Zellen lassen sich anhand ihrer Oberflächenmarker unterscheiden. Die malignen T-Zellen wurden per Durchflusszytometrie auf das Vorhandensein dieser Marker getestet. Dabei wurden sowohl die primären T-Leukämiezellen aus *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäusen als auch T-Leukämiezellen nach adoptivem Transfer in immunkompetente Mäuse untersucht, um eine Veränderung des Phänotyps im Rahmen der Passage durch die unterschiedlichen Mausstämme auszuschließen. Dies war für eine Verwendung der T-Leukämiezellen aus den adoptiven Transferversuchen für weitere Experimente entscheidend. Primäre als auch durch Mäuse passagierte T-Leukämiezellen zeigten zum größten Teil einen CD5<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Immunphänotyp. Dieser Immunphänotyp ähnelt dem von unreifen T-Zellen im Stadium der thymischen T-Zellentwicklung.<sup>4,9,14</sup> Dieser Immunphänotyp konnte allerdings nicht für alle malignen T-Zellen gezeigt werden. Von sieben *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäusen mit T-Zell-Leukämie zeigte eine Maus ausschließlich einen CD4 EP Phänotyp, während in zwei weiteren Mäusen zusätzlich zu den malignen DP T-Zellen eine T-Zell Population mit CD4 EP Phänotyp auftrat. Der CD4 EP Phänotyp ähnelt anders als der DP Phänotyp eher reifen T-Zellen nach dem Ende der thymischen T-Zellentwicklung.<sup>4,9,14</sup> Die Inhomogenität des Leukämiezellphänotyps zeigte zusammen mit den Unterschieden in der Klonalität der Tumorzellpopulationen, dass der Krankheitsverlauf der T-Zell-Leukämie in den *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäusen individuell variiert.

## Diskussion

---

Dies lässt ein spontanes oder zufälliges Element in der Entartung der T-Zellen der einzelnen Mäuse vermuten, welches die Unterschiede im Phänotyp bedingt.

Eine detaillierte Untersuchung des Phänotyps wurde an den DP T-Leukämiezellen vorgenommen, da es sich hierbei offensichtlich um die dominierende Population handelte. Weitere durchflusszytometrische Untersuchungen erlaubten einen genaueren Vergleich mit gesunden Zellen aus den verschiedenen Stadien der T-Zellentwicklung. Der CD24<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup> Phänotyp konnte in drei T-Leukämiezellklonen detektiert werden und ähnelte dabei T-Zellen aus dem DN Stadium der T-Zellentwicklung.<sup>4</sup> Dies bestärkt die Annahme, dass es sich bei der DP Leukämiezellpopulation um unreife T-Zellen handelt. Etwas Vorsicht bei der Deutung dieser Ergebnisse ist dennoch geboten, da viele der Marker auch in anderen Differenzierungsstadien exprimiert werden. So ist CD25 z.B. auch ein Marker für aktivierte T-Zellen.<sup>93</sup> Zudem exprimieren die T-Leukämiezellen den  $\alpha\beta$ -TZR auf ihrer Oberfläche, welcher im Gesunden erst von reiferen EP T-Zellen am Ende der T-Zellentwicklung exprimiert wird. Die Tatsache, dass die T-Leukämiezellen für mehrere Marker gleichzeitig sowie für CD4 und CD8 positiv sind, macht einen unreifen Phänotyp der Leukämiezellen dennoch am wahrscheinlichsten.

Neben der Ähnlichkeit zu unreifen T-Zellen auf der Ebene der Oberflächenmarker wurden auf der Ebene der Genexpression auch Ähnlichkeiten zu reiferen T-Zellen gezeigt. Mittels eines standardisierten qPCR Arrays konnten thymische DP T-Zellen mit den T-Leukämiezellen in Hinblick auf das Expressionsniveau von Genen verglichen werden, welche häufig für die Differenzierung der verschiedenen reifen TH-Zell Typen verwendet werden. Die T-Leukämiezellen zeigten gegenüber den DP Thymozyten besonders solche Gene hochreguliert, welche typisch für den TH1-Phänotyp sind. Diese Analyse wurde allerdings, im Gegensatz zur Analyse der Thymozytenmarker, nur für einen Klon durchgeführt. Zudem lässt sich anhand dieser Ergebnisse schwer ein Vergleich zwischen dem Phänotyp der malignen DP T-Zellen und reifen T-Zellen machen. Es wurden in diesem Versuch unreife DP T-Zellen aus dem Thymus als Kontrollpopulation verwendet. Somit kann angenommen werden, dass die DP T-Leukämiezellen im Vergleich zu unreifen DP T-Zellen des Thymus mehr den TH1 Zellen ähneln. In welchem Maß die malignen DP T-Zellen im direkten Vergleich den reifen T-Zellen ähneln, lässt sich aus diesen Ergebnissen schwer schließen.

Der Phänotyp der T-Leukämiezellen zeigt also hauptsächlich Merkmale von unreifen T-Zellen, weicht jedoch im Vergleich der Genexpression vom Phänotyp der unreifen T-Zellen ab. Bei diesen Unterschieden handelt es sich am wahrscheinlichsten um Merkmale, welche im Rahmen der Onkogenese durch die Tumorzellen hinzu gewonnenen wurden. Geht man von dieser

Annahme aus, so stehen diese hinzugewonnen Merkmale nicht im Widerspruch zum unreifen Charakter der malignen T-Zellen.

#### 4.1.3. Parallelen zu humanen T-Zell-Leukämien

Die Etablierung des Phänotyps der T-Zell-Leukämie der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus lässt im Anschluss den Vergleich mit dem Phänotyp verschiedener humaner T-Zell-Leukämien zu. Der DP Phänotyp der T-Zell-Leukämie der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus findet sich am häufigsten in der humanen T-ALL. Die T-ALL ist unter den T-Zell-Leukämien mit DP Phänotyp die einzige unreife Leukämie.<sup>50</sup> Dabei lässt sich die T-Zell-Leukämie der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus am ehesten mit reiferen Formen der humanen T-ALL vergleichen. Der Stammzellmarker CD34 etwa, der bei sehr unreifen humanen T-ALL Formen vorkommt, konnte hier nicht nachgewiesen werden. Analog zu reifen humanen T-ALL Formen waren die T-Leukämiezellen der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus jedoch positiv für CD3.<sup>52,58</sup>

Neben dem unreifen Immunphänotyp ähnelt sich auch der Krankheitsverlauf. Der Befall von SLOs und Haut sowie die mediastinale Raumforderung mit Thymusbefall können sowohl in der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus als auch in Fällen von humaner T-ALL gezeigt werden.<sup>50,52,58</sup> Zudem zeigen sich Parallelen in der Genexpression. Die humane T-ALL ist typischerweise assoziiert mit Fehlregulationen des Notch Signalwegs.<sup>65-67</sup> Dies konnte auch für die T-Zell-Leukämie der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus gezeigt werden. Wenn auch zur T-ALL die meisten Parallelen bestehen, so zeigten sich in einzelnen Aspekten Ähnlichkeiten zu anderen humanen T-Zell-Leukämien. Der CD4/CD8 DP Phänotyp kommt mit unterschiedlicher Häufigkeit in weiteren Formen von humaner T-Zell-Leukämie vor, wo er mit schnellem, aggressivem Tumorwachstum assoziiert ist. Bei der reifen ATLL zeigen sich in seltenen Fällen maligne T-Zellen mit DP Phänotyp.<sup>52,53</sup> Trotz ihrer Seltenheit sind diese Fälle interessant, da sie vermutlich durch die Infektion unreifer thymischer T-Zellen mit dem onkogenen HTLV-1 Virus entstehen.<sup>53</sup> Die Ähnlichkeit zum Phänotyp der T-Leukämiezellen der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus legt für die murinen T-Leukämiezellen ebenfalls einen Ursprung im Thymus nahe. Bei der ebenfalls reifen T-PLL kommt der DP Phänotyp häufiger vor. Er lässt sich in etwa einem Drittel der Erkrankungsfälle nachweisen. Zudem konnte gezeigt werden, dass in den malignen T-Zellen der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäuse eine leichte Überexpression von TCL1 vorliegt. Dies stellt eine weitere Ähnlichkeit zur T-PLL dar, deren Hauptonkogen ein überexprimiertes TCL1 ist.<sup>50,54,55</sup> Des Weiteren zeigen sich Parallelen zum Sézary Syndrom. Hier liegt wie in den *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäusen ein Hautbefall vor, welcher von einer leukämischen Komponente begleitet wird. Die leukämische Komponente hebt das Sézary Syndrom von anderen kutanen T-Zell-Leukämien ab und wird durch CD62L und

CCR7 Expression ermöglicht, welche ebenfalls auf den malignen T-Zellen der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus vorhanden sind. Die T-Zell-Leukämie der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus zeigt also diverse Parallelen zu verschiedenen humanen Leukämie Formen.

### 4.2. Ursprung der T-Zell-Leukämie

Als nächster Schritt in der Charakterisierung der T-Zell-Leukämie der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus sollten Anfang und Verlauf des Entartungsprozesses beschrieben werden, um den Ursprung dieser malignen Erkrankung zu ergründen. Dabei ließ der Phänotyp bereits erste Hypothesen über die Abstammung der Leukämiezellen zu. Der dominierende CD4/CD8 DP Phänotyp legte die Vermutung nahe, dass es sich hier um die Entartung von unreifen T-Zellen im Rahmen der thymischen T-Zellentwicklung handelte. Abweichend von dieser Hypothese konnte in einigen erkrankten Mäusen ein CD4 EP Phänotyp gezeigt werden. Die Tatsache, dass in 2 der 7 Fälle von T-Zell-Leukämie in der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus der EP und DP Phänotyp nebeneinander existieren, wirft die Frage auf, ob eine Verbindung zwischen diesen beiden entarteten T-Zell Populationen besteht. Am wahrscheinlichsten ist es, dass zwischen EP und DP T-Leukämiezellen keine kausale Verbindung besteht und es sich stattdessen tatsächlich um unabhängig voneinander entstandene Tumorzellpopulationen handelt. In einer besonders jungen *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus zeigte sich nur der CD4 EP Phänotyp, maligne DP T-Zellen konnten zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Der CD4 EP Phänotyp zeigt, dass es in den *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäusen vereinzelt auch zur Entwicklung von reiferen T-Leukämiezellen kommen kann.

#### 4.2.1. Der Thymus ist der wahrscheinlichste Ursprungsort der DP T-Leukämiezellen

Der am häufigsten auftretende DP Immunphänotyp der malignen T-Zellen legt einen Ursprung dieser Zellen in der thymischen Phase der T-Zellentwicklung nahe. Dennoch ist auch für die DP T-Leukämiezellen ein Ursprung außerhalb des Thymus denkbar. Im Menschen und in der Maus trägt ein sehr geringer Teil der T-Zellen im peripheren Blut den DP Phänotyp, 0.2% bis 8.2%<sup>108</sup>, während er bei Schweinen, Affen und Hühnern häufiger zu finden ist.<sup>109</sup> Diese Zellen wurden beim Menschen als Gedächtniszellen mit antiviraler Funktion charakterisiert.<sup>108</sup> Zudem scheinen sie mit zunehmenden Alter in einigen Patienten zu akkumulieren und konstituieren dort womöglich eine prä-leukämische Zellpopulation.<sup>110</sup> Möglicherweise hat die Entartung der T-Zellen des DP Phänotyps also nicht im Rahmen der thymischen T-Zellentwicklung stattgefunden, sondern ging von reifen DP T-Zellen außerhalb des Thymus aus. Dass der CD4/CD8 DP Phänotyp nicht immer seinen Ursprung in unreifen Vorläuferzellen hat, wird am

Beispiel der T-PLL deutlich. Der DP Phänotyp tritt in ca. einem Drittel der Fälle auf, obwohl es sich bei der Ausgangszelle um eine post-thymische periphere T-Zelle handelt.<sup>50</sup>

Eine Untersuchung der Wachstumseigenschaften der EP und DP T-Leukämiezellen konnte jedoch die Vermutung erhärten, dass der Thymus den Ursprungsort der DP T-Leukämiezellen darstellt. Eine Zellsuspension mit gleichen Anteilen von DP und EP T-Leukämiezellen wurde in immunkompetente Empfängermäuse injiziert. Dabei zeigte sich 15 Tage nach Injektion der T-Leukämiezellen in der Milz kein Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit der beiden Populationen. Im Thymus hingegen überwog eindeutig die DP Population. Das raschere Wachstum der malignen DP T-Zellen im Thymus ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die DP T-Leukämiezellen hier ihren Ursprung nahmen und noch auf die Wachstumsreize der thymischen Mikroumgebung ansprechen. Die malignen EP T-Zellen hingegen sind dazu nicht in der Lage. Das raschere Wachstum der DP T-Leukämiezellen stützt damit die Annahme, dass diese malignen T-Zellen dem Thymus entstammen. Die Tatsache, dass die CD4 EP T-Leukämiezellen im Thymus langsamer wachsen als in der Milz, unterstreicht, dass es sich hierbei um reifere T-Zellen handelt. Zusätzlich zum Transfer einer gemischten Zellsuspension mit EP und DP T-Leukämiezellen wurden weitere Empfängertiere mit FACS-sortierten EP T-Leukämiezellen transferiert. Die Reinheit der FACS-sortierten EP T-Leukämiezellen lag bei > 95%. Interessanterweise zeigte sich im Thymus der Empfängertiere das überwiegende Wachstum von DP T-Leukämiezellen. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist, dass wenige DP Zellen in der EP Population enthalten waren. Bei einem ausreichend großen Wachstumsvorteil für die DP T-Leukämiezellen im Thymus der Empfängermäuse ist es denkbar, dass trotz der geringen Ausgangszahlen nach 15 Tagen die DP Population überwog. So lässt sich erklären, wie in Mäusen, die nur mit vorwiegend EP T-Leukämiezellen injiziert wurden, DP T-Leukämiezellen nachgewiesen werden konnten. Damit scheint der Ursprung der DP T-Leukämiezellen im Thymus gesichert, auch wenn der Ursprung der EP T-Leukämiezellen unklar bleibt.

### 4.3. Mechanismen der Transformation

Eine zentrale Frage für das Verständnis einer Tumorerkrankung und für die Entwicklung neuer Therapien ist die Erforschung der intra- und extrazellulären Mechanismen, die zur malignen Transformation der T-Zellen geführt haben und ihr Wachstum aufrecht erhalten. Im Fall der T-Zell-Leukämie der *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus ließ sich auf Grund des unreifen Phänotyps vermuten, dass Mechanismen der T-Zellentwicklung eine große Rolle in der Entartung spielten. Die

Onkogenese stellt in vielen Fällen eine spontane Dysregulation physiologischer Entwicklungsprozesse dar. Im Folgenden soll erörtert werden, ob die DP T-Leukämiezellen Ergebnis eines solchen zufälligen Prozesses sind. Alternativ soll diskutiert werden, ob die Entstehung der T-Leukämiezellen auf einen intrinsischen, generalisierten Effekt des transgenen *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamms zurückzuführen ist.

### 4.3.1. *tcl1* als T-Zell Onkogen

Die Gene der TCL1-Familie sind schon lange als Onkogene in Lymphozyten bekannt und werden als solche häufig für transgene Mausmodelle genutzt. Auch in der *Eμ-Tcl1* Maus wurde es zu diesem Zweck eingesetzt. Gekoppelt an den B-Zell spezifischen *Eμ* Promoter wurde TCL1 hier zur Induktion einer murinen B-Zell-Leukämie eingesetzt, welche der humanen B-CLL ähnelt. In dem doppelt-transgenen Mausstamm, der *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus, kam es neben der Entwicklung von B-Zell-Leukämien jedoch wie beschrieben auch zu einer erhöhten Frequenz von T-Zell-Leukämien. Es ist denkbar, dass das Onkogen, welches für die Entstehung der B-Zell-Leukämien verantwortlich war, auch zu den Fällen von T-Zell-Leukämie geführt hatte. Eigentlich sollte die Kopplung an den *Eμ*-Promoter eine Expression des Onkogens ausschließlich in B-Zellen erlauben. Zunächst ließ sich vermuten, dass es durch zufällige Prozesse in einigen *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mäusen TCL1 trotz der Kopplung an den *Eμ*-Promoter zur Ausprägung von TCL1 in T-Zellen gekommen war, was eine T-Zell-Leukämie in diesen Tieren induziert hatte. Durch durchflusszytometrische Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass alle T-Zellen in Mäusen des *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Stamms sowie des *Eμ-Tcl1* Stamms zur Expression von TCL1 in der Lage waren. Damit ist es denkbar, dass der onkogene Effekt von TCL1 auf alle T-Zellen gewirkt hatte. TCL1 wird auch im Rahmen der T-Zellentwicklung physiologischer Weise von T-Zellen exprimiert. Da jedoch der *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* und der *Eμ-Tcl1* Stamm die humane Form von *tcl1* als Onkogen tragen, konnte die erhöhte Expression in den T-Zellen von einer physiologischen Expression in T-Zellen abgegrenzt werden. Über einen spezifischen Antikörper für die humane Form von TCL1 konnte sichergestellt werden, dass die erhöhte TCL1 Aktivität in den T-Zellen tatsächlich vom transgenen TCL1 herrührte. Damit ist klar, dass die Kontrolle durch den *Eμ*-Promoter nicht vollständig für die Restriktion der TCL1 Expression auf B-Zellen ausreicht. Wie genau es zur Expression des humanen transgenen TCL1 durch T-Zellen kommt, konnte nicht gezeigt werden. Wahrscheinlich handelt es sich dabei auf Grund der homogenen Expression in über 30 untersuchten Mäusen der *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* und *Eμ-Tcl1* Stämme um einen intrinsischen, generalisierten Effekt, der alle Mäuse des *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Stamms betrifft, und nicht um ein zufälliges Ereignis wie eine chromosomale Aberration. Der

$E\mu$  Promoter wird auch in anderen Mausstämmen zur Restriktion der Onkogenexpression auf B-Zellen verwendet, wie etwa im  $E\mu$ -*Myc* Mausmodell für aggressive B-Zell Lymphome.<sup>111</sup> Über die Auswirkung einer reduzierten Expressionskontrolle durch den  $E\mu$ -Promoter ist im  $E\mu$ -*Myc* Mausmodell nichts bekannt.

TCL1 vermittelt seinen Effekt in T-Zellen vor allem durch die Aktivierung von AKT1 und spielt eine wichtige Rolle in der thymischen T-Zellentwicklung.<sup>38,39</sup> Die dysregulierte Expression von TCL1 führt jedoch zur Entartung von T-Zellen.<sup>75</sup> Um zu überprüfen ob TCL1 über diese Mechanismen für die Entartung der T-Zellen in der  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> verantwortlich ist, wurde die Genexpression von Genen aus dem Akt Signalweg überprüft. Im Vergleich zu DP Thymozyten zeigten die Leukämiezellen keine signifikante Steigerung von Genen aus dem Akt Signalweg. Auch die Expression des endogenen TCL1 und von AKT1 waren unverändert. Diese Ergebnisse bedeuten nicht das Fehlen von Aktivität im Akt Signalweg. Da TCL1 physiologischerweise auch in gesunden DP Thymozyten aktiv ist, bedeuten diese Ergebnisse lediglich, dass die Genexpression in den T-Leukämiezellen der Expression in DP Thymozyten sehr ähnlich ist.<sup>38,39</sup> Zudem spielt sich ein Großteil der Aktivität im Akt Signalweg nicht in Form von Änderungen der Genexpression ab sondern durch Phosphorylierung von Zielmolekülen.<sup>42</sup> Diese Form der Aktivität wurde jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht. Es ist also weiterhin denkbar, dass die Überexpression von TCL1 zu einem verstärkten AKT1 Signal in den T-Zellen der  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mäuse geführt hat und damit zu ihrer Entartung beitrug. Die humane T-PLL macht den Effekt einer erhöhten TCL1 Aktivität anschaulich deutlich. Die Tatsache, dass unter dem Einfluss von TCL1 hier auch T-Zell-Leukämien mit DP Phänotyp entstehen, bekräftigt die Hypothese, dass auch in der  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Maus TCL1 für die Entartung der T-Zellen verantwortlich sein könnte.<sup>50</sup> Im *lck-Tcl1* Mausstamm konnte das onkogene Potential von TCL1 auch für die Maus gezeigt werden.<sup>75</sup> Allerdings konnte der DP Phänotyp hier nicht nachgewiesen werden. Zudem entwickelte ein wesentlich höherer Anteil der transgenen Mäuse eine T-Zell-Leukämie als im  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mausstamm. Die Expression von *tcl1* scheint also für den Phänotyp der  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Maus keine so prägende Rolle zu spielen. Wäre dies der Fall, so ließe sich eine größere Ähnlichkeit zum Phänotyp der *lck-Tcl1* Maus erwarten. Es ist anzunehmen, dass die durch den  $E\mu$ -Promoter zugelassene TCL1 Expression nicht so stark ist wie in Mausmodellen mit gezielter TCL1 Expression in T-Zellen. In den durchflusszytometrischen Analysen der  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> und  $E\mu$ -*Tcl1* Mäuse zeigte sich das Expressionsniveau stets niedriger als in B-Zellen. Die Tatsache, dass trotz der homogenen Positivität der T-Zellen für TCL1 im  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mausstamm nur einige Tiere tatsächlich eine T-Zell-Leukämie entwickeln, lässt vermuten, dass noch andere Faktoren an der Entartung

beteiligt sein müssen. Vermutlich bewirkt also die leichte Überexpression von TCL1 in den T-Zelle, eine Inkliniation zur Entartung, reicht jedoch nicht dazu aus die Entartung alleine herbeizuführen.

### 4.3.2. *notch1* als zentrales Onkogen der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* T-Zell-Leukämie

Da der onkogene Effekt des transgenen TCL1 nicht ausreichte, um die Entartung und den Phänotyp der DP T-Zell-Leukämie der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* zufriedenstellend zu erklären, musste es weitere für diese Prozesse relevante Faktoren geben. Auf Grund der Ähnlichkeit der Leukämiezellen zu unreifen T-Zellen des Thymus stellte sich der Notch Signalweg als vielversprechendster Kandidat dar. Seine entscheidende Bedeutung für die T-Zellentwicklung macht den Notch Signalweg gleichzeitig bei unkontrollierter Aktivität zu einem potenten Mediator der Entartung von unreifen T-Zellen.<sup>4,65</sup> Die Aktivität des Notch Signalwegs wurde mittels standardisierter qPCR Arrays überprüft. Dabei wurde das Expressionsniveau des Transkriptionsfaktors NOTCH1 und seiner Zielgene in den DP T-Leukämiezellen mit dem Expressionsniveau in DP Thymozyten verglichen. Es konnte eine starke Überexpression von NOTCH1 in den T-Leukämiezellen festgestellt werden. Die erhöhte Expression von NOTCH1 ging zudem mit der erhöhten Expression von bestimmten NOTCH1 Zielgenen einher. Auf Grund der teilweise um mehr als das Hundertfache erhöhten Expression ist eindeutig, dass es sich hier um einen pathologischen Prozess handeln muss. Die erhöhte Expression von NOTCH1 und seinen Zielgenen lässt sich dabei gut mit der Entstehung der unreifen DP T-Zell-Leukämie in der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus vereinbaren. Das Potential von NOTCH1, eine unreife DP T-Zell-Leukämie zu verursachen, wird am Beispiel der humanen T-ALL deutlich. Die auf Mutationen beruhende Überexpression von NOTCH1 wird als zentraler Faktor in der Entstehung dieser Erkrankung beschrieben, deren Phänotyp Ähnlichkeiten zur T-Zell-Leukämie der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus aufweist.<sup>4,50,62</sup> Der onkogene Effekt von NOTCH1 konnte auch im Mausmodell gezeigt werden. Eine Überexpression führte auch hier zur Entstehung einer unreifen T-ALL ähnlichen Erkrankung.<sup>65</sup> Zudem ist von den hier verstärkt exprimierten Zielgenen bekannt, dass sie für die NOTCH1 Funktion im Rahmen der T-Zellentwicklung wichtig sind und somit auch bei erhöhter NOTCH1 Aktivität dessen onkogenen Effekt vermitteln.<sup>69,99-102</sup> So weiß man etwa von HES1, dass seine Überexpression zu einer Störung der T-Zellentwicklung mit vermehrter Bildung unreifer Vorstufen sowie zur Entstehung von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP thymischen Lymphomen führt.<sup>99</sup> Die Bedeutung der überexprimierten Gene für die DP T-Zell-Leukämie der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus wird zudem durch den Vergleich der Genexpression zweier T-Leukämiezell Klone unterstrichen. Dabei zeigte sich eine vergleichbare Überexpression von



NOTCH1 sowie HES1 und DTX1 in beiden Proben. Andere Zielgene mit ähnlichen Funktionen waren jedoch unterschiedlich exprimiert. Da die T-Leukämiezellen aus beiden Tieren den gleichen unreifen DP Phänotyp tragen, handelt es sich bei den konstant überexprimierten Genen höchstwahrscheinlich um entscheidende Gene für die Ausprägung des Phänotyps. Weitere Mediatoren wie etwa c-MYC, die ebenfalls mit NOTCH1 induzierter T-Zell-Leukämie assoziiert sind, wurden hier nicht untersucht.<sup>68</sup> Es ist also möglich, dass zusätzlich zu den identifizierten überexprimierten Genen aus dem Notch Signalweg andere Faktoren für den Phänotyp der T-Zell-Leukämie mit verantwortlich sind.

Anders als in klassischen Mausmodellen der T-ALL, welche auf der gezielt induzierten Überexpression von NOTCH1 oder eines seiner Zielgenen beruhen, war im E $\mu$ -Tcl1/BCRHEL Mausstamm unklar, wodurch die erhöhte Expression von NOTCH1 und seinen Zielgenen verursacht wurde. Eine mögliche Erklärung war analog zur humanen T-ALL eine Mutation des *notch1* Gens. Die aus der humanen Erkrankung bekannten PEST und HD Mutationen treten auch in der Maus auf. Dabei stellen Deletionen der PEST Domäne mit bis zu 80% die häufigste Mutation in Mausmodellen der T-ALL dar.<sup>83,112,113</sup> Diese Mutationen verlangsamten die Degradation von NOTCH1, reichen jedoch meist nicht aus, um eine maligne Erkrankung zu initiieren. Auch mit der durch die Mutation verlängerten Halbwertszeit ist die Menge des eigentlich aktiven Signalmoleküls NIZD1 (Abbildung 2) immer noch von der Bindung eines Liganden abhängig. Zwei weitere Deletionen, die in Menschen nicht auftreten, sind wesentlich onkogener, da sie diese Abhängigkeit entfernen. Bei der Typ 1 Deletion wird ein Teil der Promotersequenz sowie das Exon 1 vom *notch1* Gen deletiert (Abbildung 19). Dadurch kommt es jedoch nicht zum Verlust der Expression. Ganz im Gegenteil ermöglicht dies die Transkription des Gens von einer kryptischen Initiationsstelle aus, wodurch vermehrt NIZD1 gebildet wird. Die Initiationsstelle liegt mitten im Gen kurz vor Exon 25, sodass der gesamte extrazelluläre und regulatorische Teil des Gens nicht mehr transkribiert wird. Stattdessen wird nur der NIZD1 Teil des Proteins unabhängig von jedem Liganden gebildet. Die Deletion vom Typ 2 führt zum gleichen Ergebnis, jedoch auf andere Art und Weise. Hier wird der gesamte extrazelluläre und regulatorische Teil des Gens auf genomischer Ebene deletiert, wobei die Promotersequenz am Anfang des Gens sowie der NIZD1 Teil intakt bleiben (Abbildung 19). Dies resultiert wie bei der Deletion vom Typ 1 in der ligandenunabhängigen Expression von NIZD1.<sup>83,113</sup> Per Immunhistochemie konnte mittels eines spezifischen Antikörpers, welcher bereits zur Analyse mehrerer humaner Tumore verwendet wurde, gezeigt werden, dass neben der erhöhten Expression des *notch1* Gens auch das eigentliche Signalmolekül NIZD1 in den T-Leukämiezellen vermehrt vorliegt (Abbildung 18).<sup>98</sup> In den untersuchten Klonen konnten die

## Diskussion

---

Typ 1 und Typ 2 Mutationen jedoch nicht nachgewiesen werden (Abbildung 20 und Abbildung 21). Ob solche Deletion in anderen Klonen vorliegen, ist offen. In den untersuchten Klonen muss dennoch ein anderer Prozess zur Überexpression von NOTCH1 geführt haben. Wahrscheinlich liegen hier andere, möglicherweise unbekannt, Mutationen vor, die im Rahmen dieser Arbeit nicht detektiert wurden. Denkbar ist aber auch, dass die erhöhte Aktivität im Notch Signalweg durch den Einfluss anderer Signalwege und nicht durch Mutationen induziert wurde. Eine Interaktion von TCL1 und dem Akt Signalweg mit dem Notch Signalweg könnte eine mögliche Erklärung darstellen. Dies ist besonders interessant, da bereits gezeigt wurde, dass in der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus eine Überaktivität von TCL1 in T-Zellen vorliegt. Bis jetzt ist nur bekannt, dass NOTCH1 Einfluss auf den Akt Signalweg nimmt. NOTCH1 ist über seinen Effektor HES1 in der Lage, den PI3K-Signalweg durch die Inhibition von PTEN zu enthemmen.<sup>102,114</sup> Über einen Einfluss von TCL1 auf den Notch Signalweg ist noch wenig bekannt, über eine entsprechende Verbindung im Fall des *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamms lässt sich nur spekulieren. Eine direkte, unvermittelte Stimulierung von NOTCH1 durch TCL1 scheint dabei wenig plausibel. Trotz der TCL1 positiven T-Zellen im *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamm ist die Frequenz der DP T-Zell-Leukämien gering. Zudem führt die Überexpression von TCL1 in den T-Zellen anderer Mausmodelle nicht zu einer T-Zell-Leukämie mit dem hier beschriebenen, durch NOTCH1 Aktivität geprägten Phänotyp.<sup>75</sup> Sollte TCL1 also eine Rolle als Aktivator von NOTCH1 spielen, müssen weitere Faktoren sein Signal modulieren.

Auch wenn die Mechanismen, welche zur erhöhten Expression von NOTCH1 und seinen Zielgenen geführt haben, weiterhin unklar bleiben, so scheint doch dieser erhöhten Aktivität im Notch Signalweg eine zentrale Rolle in der Entstehung der DP T-Zell-Leukämie der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus zuzukommen. Auf Grund der hier beschriebenen Mechanismen der Transformation lässt sich eine tentative Hypothese der Tumorentstehung formulieren. Womöglich besteht in jeder T-Zelle von Mäusen des *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamms eine leichte Prädisposition zur Tumorentstehung. Diese kommt durch die Expression von TCL1 zustande, welche in T-Zellen trotz der Kontrolle durch den *E $\mu$*  Promoter möglich ist. Während der physiologischen T-Zellentwicklung kommt es zu einer Mutation im Notch Signalweg. Dadurch werden die charakteristischen Eigenschaften unreifer Zellen, wie etwa die Fähigkeit zur Zellteilung, konserviert.<sup>101</sup> Weitere Mutationen verstärken möglicherweise diese Eigenschaften oder geben den Tumorzellen zusätzliche Eigenschaften wie die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren der Mikroumgebung.

#### 4.4. Bedeutung der Stromazellinteraktion für die Onkogenese

Entscheidend für die Entstehung und Erhaltung von Tumorerkrankungen sind nicht nur Veränderungen der zellinternen Signalwege, sondern auch die Einflüsse der Mikroumgebung.<sup>105</sup> Lymphatische Zellen werden sowohl im Rahmen der Entwicklung als auch im Rahmen von Entzündungsprozessen durch die Stromazellen ihrer Umgebung proliferativen Reizen ausgesetzt.<sup>4,115</sup> Diese Mechanismen werden auch von malignen lymphatischen Zellen zur Erhaltung ihres proliferativen Potentials und zum Apoptose-Schutz genutzt.<sup>80,116,117</sup> Diese Mechanismen haben direkte Auswirkung auf die Aggressivität von lymphatischen Tumoren und auf die Überlebenschancen von betroffenen Patienten. Zum Beispiel konnte beim Follikulären Lymphom das Vorhandensein von tumorstimulierenden Stromazellen in Gewebeproben als negativer prädiktiver Marker etabliert werden.<sup>118</sup> Der Zugang zu solch einer protektiven und stimulierenden Mikroumgebung wird durch die Fähigkeit zur Migration und Adhäsion bestimmt. Diese Prozesse werden durch das Chemokin/Chemokinrezeptorsystem zusammen mit Adhäsionsmolekülen vermittelt. Unterschiede im Expressionsprofil von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen können so zu Unterschieden im Krankheitsverlauf, im Disseminationsmuster und in der Aggressivität von lymphatischen Tumoren führen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster für Chemokinrezeptoren und für Adhäsionsmoleküle auf den T-Leukämiezellen der *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus charakterisiert. Im Unterschied zu den malignen *Eμ-Tcl1* B-Zellen zeigten die DP T-Leukämiezellen neben der Expression von CCR7 und CXCR4 auch eine deutliche Expression des L-Selektins CD62L. Dadurch waren die T-Leukämiezellen nicht nur zur Migration in die Milz, sondern auch zur Migration in die Lymphknoten und in den Thymus befähigt. Die gleichzeitige Expression von CCR7 und CD62L befähigt sowohl gesunde als auch maligne T-Zellen in die T-Zell-Zone von SLOs im Allgemeinen und von Lymphknoten im Besonderen einzuwandern.<sup>47</sup> Das Vorhandensein dieser Moleküle ist für die Migration über die in der T-Zell-Zone der Lymphknoten gelegenen HEVs essentiell. Zudem vermittelt CCR7 die Migration von Progenitorzellen zum Thymus im Rahmen der T-Zellentwicklung.<sup>45,46</sup> Die Funktionalität des CCR7 Rezeptors auf den malignen T-Zellen konnte in Chemotaxis Assays gezeigt werden. Dabei handelt es sich um etablierte in vitro Analysen, in denen die zu untersuchenden Zellen auf einen Chemokinreiz hin durch eine Filtermembran wandern müssen. Dieser in vitro Prüfung der Migrationsfähigkeit schloss sich die in vivo Prüfung in Transferexperimenten an. Nach der Injektion von DP T-Leukämiezellen in immunkompetente Empfängermäuse konnte die Migration der Leukämiezellen in die SLOs nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine klare

## Diskussion

---

Migration von T-Leukämiezellen in die Milz und in die Lymphknoten. Dabei zeigten sich die T-Leukämiezellen bereits nach 24 Stunden in Milz und Lymphknoten. Sowohl in der Durchflusszytometrie als auch in der Immunhistologie konnten zu diesem frühen Zeitpunkt in der Milz wesentlich größere Zahlen an T-Leukämiezellen nachgewiesen werden. Ob dies bedeutet, dass die T-Zellen hier besonders schnell proliferieren oder ob diese Zahlen auf eine schnellere Migration und ein erleichtertes Einwandern in die Milz zurückzuführen sind, ist unklar. Die injizierten Zellen waren zuvor aus der Milz erkrankter Tiere gewonnen worden. Das verstärkte Wachstum in der Milz ist daher womöglich vor allem ein Zeichen der Adaptation an ihren ursprünglichen Proliferationsort.

Es ist anzunehmen, dass sowohl in der Milz als auch in den Lymphknoten eine wachstumsfördernde Nische für die T-Leukämiezellen besteht. In der *E $\mu$ -Myc* Maus, einem Modell für aggressive B-Zell Lymphome, konnte die CCR7 abhängige Migration von malignen B-Zellen in die wachstumsfördernde Mikroumgebung der T-Zell-Zone von Lymphknoten und Milz gezeigt werden.<sup>119</sup> Maligne B-Zellen gehen hier eine Interaktion mit FRZs ein, wodurch ihnen über das Hedgehog Protein IHH der Schutz vor Apoptose vermittelt wird.<sup>119</sup> In gesunden Tieren läuft eine vergleichbare Interaktion zwischen FRZs und gesunden, naiven T-Zellen ab.<sup>120</sup> Zudem konnte in der *E $\mu$ -Myc* Maus eine Interaktion der malignen B-Zellen mit DZs gezeigt werden, welche das Überleben der malignen B-Zellen unterstützte.<sup>121</sup> Des Weiteren konnte für beide Tumor-Stroma Interaktionen gezeigt werden, dass sie aktiv durch die malignen B-Zellen aufrechterhalten wurden.<sup>119,121</sup> Da die malignen B-Zellen der *E $\mu$ -Myc* Maus wie die T-Leukämiezellen der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus positiv für CCR7 und CD62L sind, lässt sich für die T-Leukämiezellen eine ähnliche wachstumsfördernde Interaktion mit denselben in der T-Zell-Zone lokalisierten Stromazellsubpopulationen vermuten. In einem NOTCH1 abhängigen murinen T-ALL Modell konnte eine bevorzugte Migration maligner T-Zellen in die Milz gezeigt werden, welche einen Überlebensvorteil für die malignen T-Zellen vermittelte.<sup>81</sup> Diese Erkenntnisse zusammen mit der intensiven Interaktion gesunder T-Zellen mit Stromazellen unterstreichen die Hypothese einer wachstumsfördernden Interaktion von T-Leukämiezellen mit DZs und FRZs.<sup>86-88</sup> In immunhistologischen Untersuchungen von gesunden Empfängermäusen am 4. Tag nach Transfer von DP T-Leukämiezellen zeigte sich eine Akkumulation von T-Leukämiezellen an der Grenze zwischen B-Zell Zone und T-Zell-Zone in der weißen Pulpa der Milz sowie in der T-Zell-Zone von Lymphknoten. Durch die immunhistologische Darstellung der Stromazellen der T-Zell-Zone konnte in einem der zwei untersuchten Klone gezeigt werden, dass es sich hierbei vornehmlich um eine Assoziation der T-Leukämiezellen mit DZs handelt. Diese waren vermehrt an der Grenzzone zwischen T- und B-Zell Zone zu finden. Zu den eher

zentral gelegenen FRZ-Netzwerken zeigte sich eine geringere Assoziation. Daraus lässt sich schließen, dass die T-Leukämiezellen mit verschiedenen Stromazellen der T-Zell-Zone in Kontakt stehen, wenn auch unklar ist, ob die Interaktion mit DZs präferiert wird. Es lässt sich zudem vermuten, dass die Interaktion der malignen T-Zellen mit den DZs und in geringerem Maße die Interaktion mit den FRZs einen Wachstumsvorteil für die T-Leukämiezellen darstellt. Dieser Wachstumsvorteil würde auch die bevorzugte Lokalisation der T-Leukämiezellen in diesem Bereich der T-Zell-Zone von Milz und Lymphknoten erklären. Allerdings konnte in dieser Arbeit noch nicht definitiv gezeigt werden, ob und über welche Mechanismen die Interaktion mit den Stromazellen der T-Zell-Zone ein Wachstums- oder Überlebenssignal vermittelt. Analog zur onkogenen Wirkung der oben beschriebenen Signalwege lässt sich jedoch vermuten, dass sich die malignen T-Zellen auch hier abgewandelter physiologischer Prozesse bedienen. Im Rahmen der adaptiven Immunantwort stellt die Interaktion zwischen naiven T-Zellen und antigenpräsentierenden Stromazellen über die Stimulierung des TZR einen zentralen Reiz für die T-Zell Reaktion dar.<sup>86,87,122</sup> Auf Grund des auf den malignen T-Zellen vorhandenen  $\alpha\beta$ -TZR ist eine ähnlich stimulierende Interaktion zwischen T-Leukämiezellen der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus und DZs der T-Zell-Zone durchaus denkbar und könnte Ursache für den Wachstumsvorteil sein, den die T-Leukämiezellen in der Milz und im Lymphknoten erfahren. Weitere Versuche sind jedoch nötig um diese Hypothese zu prüfen.

Sowohl für gesunde T-Zellen als auch für die malignen T-Zellen des NOTCH1 abhängigen T-ALL Modells sowie für die malignen B-Zellen der *E $\mu$ -Myc* Maus ist bekannt, dass die Migration in die T-Zell-Zone von SLOs von CCR7 abhängt.<sup>4,81,119</sup> Aus der *E $\mu$ -Myc* Maus ist zudem bekannt, dass die Interaktion mit FRZs ebenfalls entscheidend von CCR7 abhängt.<sup>119</sup> Durch den Transfer der DP T-Leukämiezellen in Empfängermäuse des *plt/plt* Mausstamms sollte geprüft werden, welche Auswirkung die Inhibition CCR7-vermittelter Signale auf die Interaktion der malignen T-Zellen der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus mit den Stromazellen der SLOs hat. Der Transfer in den *plt/plt* Mausstamm stellte eine effektive Methode dar, die Kommunikation über den CCR7 Rezeptor zu unterbinden. Die *plt/plt* transgenen Mäuse sind nicht in der Lage die Liganden für den CCR7 Rezeptor zu bilden. Das Fehlen dieser Liganden führt in den Empfängertieren zu einer Störung der Architektur der SLOs unter anderem mit einer Zerstörung der T-Zell-Zone. In den *plt/plt* Mäusen konnte trotz Abwesenheit CCR7-vermittelter Migrationssignale eine Kolokalisation von T-Leukämiezellen und DZs detektiert werden. Über das Migrationsverhalten der T-Leukämiezellen in die Milz lässt sich auf Grund der gestörten Architektur der SLOs in *plt/plt* Mäusen nur sehr begrenzt eine Aussage treffen. So ist anzunehmen, dass die T-Leukämiezellen für den Eintritt in eine intakte T-Zell-Zone von einer

funktionierenden CCL19/CCL21/CCR7 Signalachse abhängig gewesen wären. Die Einwanderung von T-Leukämiezellen über HEVs in die Lymphknoten der *plt/plt* Mäuse sollte stark eingeschränkt sein, da dieser Eintrittsweg sehr viel stärker von CCR7-vermittelten Signalen abhängt als eine Einwanderung in die Milz. Und in der Tat, transferierte T-Leukämiezellen zeigten ein verlangsamtes Einwandern in LNs von *plt/plt* Mäusen im Vergleich zu den LNs von Wt-Empfängertieren. Zusammenfassend deuten die Versuche in *plt/plt* Mäusen darauf hin, dass der Chemokinrezeptor CCR7 ebenfalls eine wichtige Rolle für die Migration und Positionierung der T-Leukämiezellen spielt.

Neben CCR7 zeigten sich die T-Leukämiezellen auch positiv für den Chemokinrezeptor CXCR4, welcher auch eine Rolle in der Onkogenese von Leukämien und Lymphomen spielt. In gesunden T-Zellen ist CXCR4 nicht nur für die Migration bedeutsam, sondern kann auch die Proliferation stimulieren.<sup>49</sup> Diesen Effekt machen sich auch maligne Zellen zunutze, weshalb CXCR4 in vielen Krebsarten wie Sézary Syndrom, Mammakarzinom, Ovarialkarzinom und Prostatakarzinom überexprimiert ist.<sup>123,124</sup> Wie wichtig CXCR4 für die DP T-Zell-Leukämie ist, lässt sich anhand seiner Expression durch die malignen T-Zellen der *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus nur vermuten. Definitive Aussagen sind nicht möglich, da zu dieser Frage keine weiteren Analysen durchgeführt wurden. Ähnlich steht es mit dem Rezeptor CCR9. Dieser Chemokinrezeptor vermittelt neben seiner Rolle in der Migration von T-Zellen in die Dünndarmwand auch anti-apoptotische Signale und ist assoziiert mit aggressiver T-ALL.<sup>125,126</sup> Zudem ist er entscheidend an der Thymusentwicklung beteiligt.<sup>4,127</sup> Die Assoziation mit T-ALL kommt über die Hochregulation von CCR9 durch NOTCH1 zustande.<sup>128</sup> Wie CXCR4 ist auch CCR9 in den DP T-Leukämiezellen exprimiert, doch wurden auch hier keine weiteren Analysen zur Bedeutung des Rezeptors für die T-Leukämiezellen durchgeführt. Sollte sich tatsächlich die Hypothese einer stimulierenden Interaktion zwischen DZs und T-Leukämiezellen bestätigen, würde die Unterbindung dieser Interaktion einen neuen potentiellen Therapieansatz darstellen.

### 4.5. Verminderte Konkurrenz durch maligne B-Zellen unterstützt die Entstehung von T-Zell-Leukämien in der *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus

Der detaillierte Vergleich der T-Zell-Leukämie der *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus zeigte eindeutige Parallelen zur humanen T-ALL. Vergleicht man die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse mit der Forschung an murinen T-ALL Modellen, so zeigen sich ebenfalls viele Parallelen. Im murinen Tumormodell wurde *notch1* zuerst als Onkogen in der T-ALL beschrieben.<sup>64,65</sup> Daraufhin wurde die Rolle von NOTCH1 Zielgenen wie *hes1* in der Onkogenese beschrieben.<sup>69</sup>

Zudem konnte in einem Mausmodell die Entstehung der typischen Mutationen im *notch1* Gen nachvollzogen werden. Durch das Erzeugen chromosomaler Instabilität konnten in der TKO Maus spontane Mutationen nachgewiesen werden, die den häufigen Notch-Mutationen im Menschen gleichen.<sup>129</sup> In IKAROS defizienten Mäusen konnte eine T-ALL erzeugt werden, welche auf spontane Mutationen des *notch1* Gens zurückging.<sup>113</sup> Dabei wurde die erhöhte Aktivität von NOTCH1 auf eine Deletion zurückgeführt, welche parallel in mehreren murinen T-ALL Zelllinien beschrieben worden war.<sup>83</sup> Analog zu den vielen Mausstämmen, welche der Erforschung der T-ALL dienten, zeigte sich in der *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus, vermutlich ausgelöst durch erhöhte NOTCH1 Expression und vermittelt durch Zielgene wie *hes1*, eine unreife DP T-Zell-Leukämie. Der erhöhten NOTCH1 Aktivität liegen dabei vermutlich ebenfalls spontane Mutationen zugrunde. Anders als bei vielen dieser T-ALL Mausmodelle ist in der *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus jedoch unbekannt, was zur Initiation der malignen Transformation führte. In vielen anderen Mausmodellen wurde die T-ALL gezielt durch das Einbringen von Onkogenen induziert. In der *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus scheint die T-Zell-Leukämie jedoch spontan zu entstehen. Die Identität der malignen T-Zellen sowie die zellulären Mechanismen der Entartung und der Proliferation der T-Leukämiezellen wurden bereits erörtert. Im Folgenden sollen die Umstände diskutiert werden, welche das Entstehen dieser malignen T-Zell-Leukämie ermöglichten.

Der *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamm scheint offensichtlich gegenüber dem *Eμ-Tcl1* Mausstamm das Entstehen von T-Zell-Leukämien zu begünstigen, während die Entstehung von BCR<sup>HEL</sup> positiven B-Zell-Leukämien nicht beobachtet wurde. Die Positivität der T-Zellen für TCL1 stellt möglicherweise einen leichten onkogenen Stimulus für die T-Zellen dar. Die Positivität für TCL1 kann allein jedoch nicht den Unterschied zwischen dem *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* und dem *Eμ-Tcl1* Mausstamm erklären, da sie in beiden Mausstämmen gleichermaßen besteht. Möglicherweise ist die erhöhte Frequenz von T-Zell-Leukämien ein Sekundäreffekt der durch die Kreuzung mit dem BCR<sup>HEL</sup> Mausstamm verursachten Verringerung der Frequenz der Entstehung von murinen B-Zell-Leukämien im *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamm. Die Verringerung der Frequenz der B-Zell-Leukämie in der *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus geht auf den BCR<sup>HEL</sup> Rezeptor selbst zurück. Er wurde ursprünglich eingebracht, um den Einfluss von spezifischer Antigenstimulation auf die B-Zell-Leukämie Entstehung zu untersuchen. Die Beschränkung des BCR auf die Erkennung eines einzelnen Antigens führte allerdings dazu, dass keine BCR<sup>HEL</sup> positiven malignen B-Zellen entstanden. Vereinzelt entstanden stattdessen BCR<sup>HEL</sup> negative maligne B-Zellen oder die hier untersuchten T-Zell-Leukämien. Die BCR<sup>HEL</sup>-Positivität geht mit einer starken Einschränkung der Antigenbindungsfähigkeit auf den B-Zellen einher. In der

## Diskussion

---

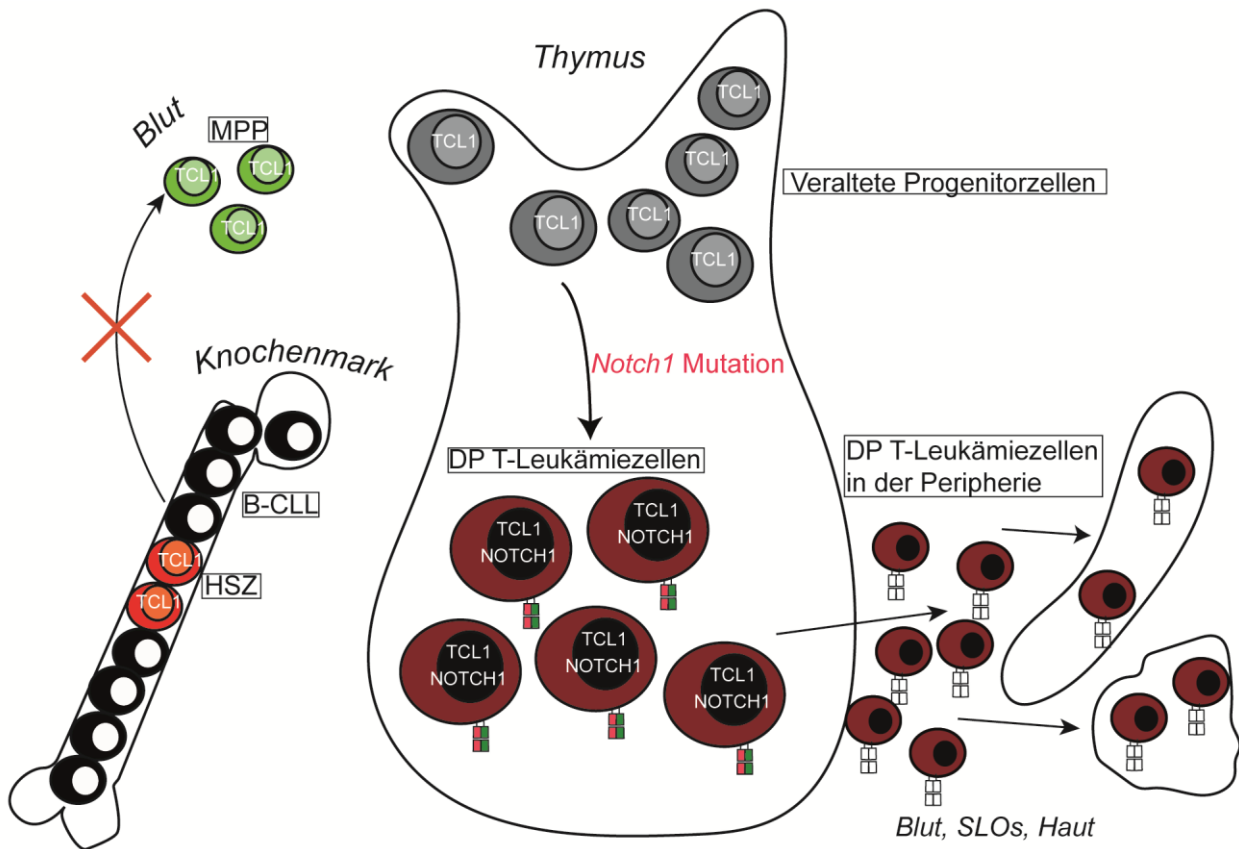
Entwicklung von B-Zell Lymphomen spielt die Stimulation von niedrig-affinen BZR mit einer Reihe von Antigenen eine wichtige Rolle.<sup>130</sup> Für den *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamm konnte gezeigt werden, dass B-Zellen mit einzelnen hochaffinen BZR, wie dem Rezeptor für das HEL Antigen, mit und ohne Antigenstimulation in der Leukämieentwicklung benachteiligt sind.<sup>85,130</sup> Durch Austausch des hochaffinen BCR<sup>HEL</sup> mit niedrig affinen B-Zell Rezeptoren konnte der Wachstumsnachteil rückgängig gemacht werden.<sup>130</sup> Eine andere Möglichkeit, diesen Nachteil zu überwinden, ist die Verwendung eines sehr starken onkogenen Stimulus. Dies wird am *E $\mu$ -Myc/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamm deutlich. In diesem Mausstamm konnte die Häufigkeit von BCR<sup>HEL</sup> positiven B-Zell Lymphomen durch Stimulation mit HEL gesteigert werden.<sup>131</sup> Dies scheint nur möglich gewesen zu sein, da es sich bei *myc* um ein wesentlich stärkeres Onkogen handelt als bei *tcl1*. Somit wird deutlich, wie es zur verringerten Frequenz der B-Zell-Leukämien im *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamm kommen konnte.

Eine Folge dieser verringerten Frequenz könnten verbesserte Proliferationsbedingungen für maligne T-Zellen sein. Die proliferierenden B-Leukämiezellen besiedeln ähnlich den T-Leukämiezellen die Milz und andere Organe, sodass eine Konkurrenz zwischen den beiden malignen Zellpopulationen denkbar ist. Die B-Leukämiezellen des *E $\mu$ -Tcl1* Mausstamms verfügen über ein großes proliferatives Potential und verdrängen dadurch vermutlich weniger potente maligne T-Zellen, die durch die Positivität für TCL1 gelegentlich entstehen. Deshalb kommt es trotz der Positivität der T-Zellen für TCL1 in der *E $\mu$ -Tcl1* Maus sehr selten zur manifesten Ausbildung von T-Zell-Leukämien. Die geringere Frequenz der B-Zell-Leukämien im *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamm könnte also durch Verringerung der Konkurrenz mit malignen T-Zellen in einer erhöhten Frequenz von T-Zell-Leukämien resultieren. Jedoch kann diese Hypothese nicht den NOTCH1 bedingten DP Phänotyp der T-Zell-Leukämie der *E $\mu$ -Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus erklären. Eine alternative Hypothese beruht auf einem kürzlich beschriebenen regulatorischen Prozess in der T-Zellentwicklung. Dieser durch Martins und Kollegen beschriebene Prozess scheint auch eine wichtige Rolle in der Entstehung von unreifen T-Zell-Leukämien zu spielen. Die Gruppe konnte zeigen, dass ein konstanter Nachschub von T-Progenitorzellen essentiell für eine geregelte T-Zellentwicklung ist.<sup>132</sup> Die Präsenz von jungen Progenitorzellen im Thymus garantiert die Apoptose von veralteten Progenitorzellen, vermutlich durch die Konkurrenz um IL7. Dieses Signal ist wiederum an die Expression des antiapoptotischen Faktors BCL2 gekoppelt. Da junge T-Zell Progenitoren sensibler auf das IL7 Signal reagieren, sind sie besser vor Apoptose geschützt als ihre veralteten Vorgänger.<sup>132</sup> Verhindert man nun jedoch im Mausexperiment den Nachschub neuer Progenitoren, zeigen die alten Progenitorzellen bereits nach 14 Tagen prä-leukämische Veränderungen der Genexpression



und es entsteht mit einer Latenz von ca. 17 Wochen eine T-ALL ähnliche DP T-Zell-Leukämie, welche im Knochenmark und in der Milz angesiedelt ist.<sup>132</sup> Die Entartung der veralteten Progenitorzellen war dabei auf erhöhte NOTCH1 Aktivität zurückzuführen. Es konnten Mutationen der HD und PEST Domäne des *notch1* Gens sowie Deletionen des 5'Endes detektiert werden. Zudem konnte die erhöhte Expression von NOTCH1 Zielgenen wie *dtx1* und *lmo2* gezeigt werden. Die Analyse des Genexpressionsprofils zeigte dabei am meisten Ähnlichkeit zu DN3/DN4 T-Zellen der intrathymischen T-Zellentwicklung.<sup>132</sup> Die durch Progenitorzelldeprivation erzeugte murine T-ALL zeigt also viele Ähnlichkeiten zur hier beschriebenen DP T-Zell-Leukämie. Möglicherweise ist die DP T-Zell-Leukämie des *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamms also auf den gleichen Prozess zurückzuführen.

Soll die Progenitordeprivation als Hypothese für die Entstehung der T-Zell-Leukämie in der *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus dienen, so stellt sich hier die Frage, über welchen Mechanismus es zum Abbruch der Migration junger Progenitorzellen in den Thymus kommt. Anders als in der Arbeit von Martins und Kollegen wurde im *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamm keine gezielte Unterbrechung dieser Migration vorgenommen. Eine mögliche Erklärung für einen Abbruch der Progenitormigration könnte die Entstehung von BCR<sup>HEL</sup> negativen B-Zell-Leukämien im *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Mausstamm darstellen. Möglicherweise führt ein verdrängendes Wachstum von B-Leukämiezellen im Knochenmark der betroffenen *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus zur Unterbrechung des Nachschubs von T-Progenitorzellen aus dem Knochenmark in den Thymus. Durch den Ausfall der Competition mit jungen Progenitorzellen kommt es dann zur Entartung von alten Progenitorzellen, unterstützt durch den leichten onkogenen Reiz des transgenen TCL1 sowie durch spontane Mutationen des *notch1* Gens (Abbildung 22). Voraussetzung für diese Hypothese ist, dass die auf diese Weise neu entstandenen T-Leukämiezellen in der Lage sein müssen, die vorbestehende B-Zell-Leukämie zu verdrängen. Dies konnte zumindest in einem Fall von T-Zell-Leukämie für die *Eμ-Tcl1/BCR<sup>HEL</sup>* Maus gezeigt werden. In einem Klon konnte noch vor dem Entstehen der T-Zell-Leukämie eine B-Zell-Leukämie nachgewiesen werden, welche nach dem Entstehen der T-Zell-Leukämie nicht mehr nachzuweisen war.



**Abbildung 22 Hypothese der Leukämieentstehung durch gestörte Progenitorzellkompetition** Die Positivität für TCL1 stellt einen leichten onkogenen Stimulus für die T-Zellen der  $E\mu-Tcl1/BCR^{HEL}$  Maus dar, der allein nicht die Transformation der T-Zellen bewirken kann. In manchen Tieren kommt es durch verdrängendes Wachstum von B-Leukämiezellen (B-CLL) im Knochenmark zu einer Progenitordeprivation im Thymus. Der Wegfall von Konkurrenz führt zur Entartung von veralteten Progenitorzellen, getrieben durch spontane Notch Mutationen.

Ob das Vorbestehen der B-Zell-Leukämie tatsächlich das Entstehen der T-Zell-Leukämie begünstigt, konnte noch nicht gezeigt werden. Zudem muss einschränkend bedacht werden, dass dieser Mechanismus ebenso auch in der  $E\mu TCL1$  Maus ablaufen könnte. Schließlich ist hier die Inzidenz von B-Zell-Leukämien höher, wodurch es häufiger zur Unterbindung des Progenitorzellnachschiebes kommen müsste. Mit dieser Hypothese kann also eventuell der Phänotyp der T-Zell-Leukämie der  $E\mu-Tcl1/BCR^{HEL}$  Maus erklärt werden, jedoch nicht ihr vermehrtes Auftreten im Vergleich zur  $E\mu TCL1$  Maus. Dennoch ist diese Hypothese interessant. Zum Einen könnte auf diese Weise erklärt werden, warum es in der  $E\mu-Tcl1/BCR^{HEL}$  Maus gerade im Rahmen der T-Zellentwicklung zu einer Entartung von T-Zellen kommt. Sollte sich zudem zeigen, dass die Progenitordeprivation in der  $E\mu-Tcl1/BCR^{HEL}$  Maus tatsächlich durch eine vorbestehende B-Zell-Leukämie zustande kommt, so würde dies das Modell von Martins und Kollegen erweitern. In ihrer Arbeit konnten sie zwar zeigen, dass die Progenitordeprivation

eine T-ALL ähnliche T-Zell-Leukämie verursacht. Sie konnten jedoch noch kein Beispiel dafür liefern, wie diese Progenitordeprivation zustande kommt.

#### 4.6. Ausblick

Der  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mausstamm liefert neben den bereits gewonnenen Erkenntnissen mehrere Angriffspunkte für die weitere Forschung. Die NOTCH1 Überaktivität bedingt den DP Phänotyp. Spontane Mutationen sind vermutlich die Ursache der erhöhten Aktivität, doch sind weitere ausführlichere Analysen notwendig, um dies zu beweisen. So ließen sich zum Beispiel die Mutations-Analysen auf weitere T-Zell-Leukämie Klone des  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mausstamms ausweiten. Zudem könnte geprüft werden, ob die häufigeren PEST oder HD Mutationen vorliegen. Das Nebeneinander von überexprimiertem TCL1 und mutiertem NOTCH1 im  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mausstamm wirft die Frage nach einer Interaktion der beiden Signalwege auf. Diese Frage ließe sich möglicherweise durch eine Analyse der Phosphorylierungsmuster verschiedener Signalmoleküle oder durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren beantworten.

Die Lokalisation und Expansion in Milz und Lymphknoten ist vermutlich durch die Kolokalisation mit Stromazellen wie DZs und FRZs bedingt. Doch um zu beweisen, dass tatsächlich eine Interaktion mit onkogenem Stimulus für die T-Leukämiezellen stattfindet, müsste man durch Inhibition der Interaktion eine Wachstumsreduktion erzielen. Eine andere Möglichkeit, mehr über die Bedeutung dieser Interaktion für die Onkogenese zu erfahren, wäre die Kokultivierung der malignen T-Zellen mit Stromazellen. Zudem ließe sich in dieser Kokultur durch den Einsatz von Chemotherapeutika die Bedeutung der Interaktion mit Stromazellen für die Chemotherapieresistenz untersuchen. Um zu zeigen, dass eine Deprivation von Progenitorzellen des Thymus mit verantwortlich für das Entstehen der T-Zell-Leukämie im  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mausstamm ist, sind ebenfalls weitere Versuche nötig. So müsste zum Beispiel gezeigt werden, dass in Mäusen mit B-Zell-Leukämie tatsächlich die Zahl der jungen Progenitorzellen im Thymus reduziert ist. Zudem müsste gezeigt werden, dass die Entartung der T-Zellen tatsächlich auf diese Reduktion zurückzuführen ist, zum Beispiel indem durch Rekonstituierung der Progenitorzellen die Entartung von T-Zellen verhindert wird. Diese vielen offenen Fragen zeigen, dass die malignen T-Zellen des  $E\mu$ -*Tcl1*/BCR<sup>HEL</sup> Mausstamms über die hier beschriebenen Versuche hinaus zur weiteren Erforschung der T-ALL und von Leukämien im Allgemeinen eingesetzt werden könnten.

### 5. Literaturverzeichnis

1. Gesundheit - Todesursachen in Deutschland 2013. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt; 2014.
2. Krebs in Deutschland 2011/2012. In: Krebsregisterdaten Zf, ed. Berlin: Robert-Koch-Institut; 2015:135-6.
3. Bhandoola A, von Boehmer H, Petrie HT, Zuniga-Pflucker JC. Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity* 2007;26:678-89.
4. Koch U, Radtke F. Mechanisms of T cell development and transformation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;27:539-62.
5. Murphy K, Mowat A, Weaver CT. *Janeway's Immunobiology*. New York, USA: Garland Science; 2012:290-331.
6. Lind EF, Prockop SE, Porritt HE, Petrie HT. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 2001;194:127-34.
7. Shortman K, Wu L. Early T lymphocyte progenitors. *Annu Rev Immunol* 1996;14:29-47.
8. von Boehmer H. Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. *Nat Rev Immunol* 2005;5:571-7.
9. Shah DK, Zuniga-Pflucker JC. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J Immunol* 2014;192:4017-23.
10. Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2002;2:336-45.
11. Xiong N, Raulet DH. Development and selection of gammadelta T cells. *Immunol Rev* 2007;215:15-31.
12. Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998;279:1737-40.

13. Ebert LM, Meuter S, Moser B. Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance. *J Immunol* 2006;176:4331-6.
14. Pang S S, Berry R, Chen Z, Kjer-Nielsen L, Perugini M A, King GF, Wang C, Chew S H, La Gruta NL, Williams NK, Beddoe T, Tiganis T, Cowieson NP, Godfrey DI, Purcell AW, Wilce MC, McCluskey J, Rossjohn J. The structural basis for autonomous dimerization of the pre-T-cell antigen receptor. *Nature* 2010;467:844-8.
15. Huesmann M, Scott B, Kisielow P, von Boehmer H. Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell* 1991;66:533-40.
16. Hogquist KA, Tomlinson AJ, Kieper WC, McGargill MA, Hart MC, Naylor S, Jameson SC. Identification of a naturally occurring ligand for thymic positive selection. *Immunity* 1997;6:389-99.
17. Egawa T, Littman DR. ThPOK acts late in specification of the helper T cell lineage and suppresses Runx-mediated commitment to the cytotoxic T cell lineage. *Nat Immunol* 2008;9:1131-9.
18. Taniuchi I, Osato M, Egawa T, Sunshine MJ, Bae SC, Komori T, Ito Y, Littman DR. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 2002;111:621-33.
19. Woolf E, Xiao C, Fainaru O, Lotem J, Rosen D, Negreanu V, Bernstein Y, Goldenberg D, Brenner O, Berke G, Levanon D, Groner Y. Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7731-6.
20. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* 2014;14:377-91.
21. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2001;2:1032-9.
22. Kishimoto H, Sprent J. Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med* 1997;185:263-71.
23. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 2009;9:833-44.

## Literaturverzeichnis

---

24. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkman V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 2004;427:355-60.
25. Weinreich MA, Hogquist KA. Thymic emigration: when and how T cells leave home. *J Immunol* 2008;181:2265-70.
26. Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, Aguet M. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 1999;10:547-58.
27. Penton AL, Leonard LD, Spinner NB. Notch signaling in human development and disease. *Semin Cell Dev Biol* 2012;23:450-7.
28. Guruharsha KG, Kankel MW, Artavanis-Tsakonas S. The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat Rev Genet* 2012;13:654-66.
29. Capaccione KM, Pine SR. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis* 2013;34:1420-30.
30. Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 2009;137:216-33.
31. Kovall RA, Blacklow SC. Mechanistic insights into Notch receptor signaling from structural and biochemical studies. *Curr Top Dev Biol* 2010;92:31-71.
32. Sambandam A, Maillard I, Zediak VP, Xu L, Gerstein RM, Aster JC, Pear WS, Bhandoola A. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat Immunol* 2005;6:663-70.
33. Bell JJ, Bhandoola A. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature* 2008;452:764-7.
34. Wolfer A, Wilson A, Nemir M, MacDonald HR, Radtke F. Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes. *Immunity* 2002;16:869-79.

35. Naito T, Tanaka H, Naoe Y, Taniuchi I. Transcriptional control of T-cell development. *Int Immunol* 2011;23:661-8.
36. Ciofani M, Knowles GC, Wiest DL, von Boehmer H, Zuniga-Pflucker JC. Stage-specific and differential notch dependency at the alphabeta and gammadelta T lineage bifurcation. *Immunity* 2006;25:105-16.
37. Wolfer A, Bakker T, Wilson A, Nicolas M, Ioannidis V, Littman DR, Lee PP, Wilson CB, Held W, MacDonald HR, Radtke F. Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development. *Nat Immunol* 2001;2:235-41.
38. Kang SM, Narducci MG, Lazzeri C, Mongiovi AM, Caprini E, Bresin A, Martelli F, Rothstein J, Croce CM, Cooper MD, Russo G. Impaired T- and B-cell development in Tc11-deficient mice. *Blood* 2005;105:1288-94.
39. Teitell MA. The TCL1 family of oncoproteins: co-activators of transformation. *Nat Rev Cancer* 2005;5:640-8.
40. Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, Bichi R, Tresini M, Malstrom S, Russo G, Tschlis P, Croce CM. Tc11 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3028-33.
41. Laine J, Kunstle G, Obata T, Sha M, Noguchi M. The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Mol Cell* 2000;6:395-407.
42. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261-74.
43. Noguchi M, Ropars V, Roumestand C, Suizu F. Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt. *Faseb j* 2007;21:2273-84.
44. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217-42.
45. Krueger A, Willenzon S, Lyszkiewicz M, Kremmer E, Forster R. CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. *Blood* 2010;115:1906-12.

## Literaturverzeichnis

---

46. Zlotoff DA, Sambandam A, Logan TD, Bell JJ, Schwarz BA, Bhandoola A. CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood* 2010;115:1897-905.
47. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999;99:23-33.
48. Stein JV, Nombela-Arrieta C. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology* 2005;116:1-12.
49. Trampont PC, Tosello-Trampont AC, Shen Y, Duley, AK, Sutherland AE, Bender TP, Littman, DR, Ravichandran KS. CXCR4 acts as a costimulator during thymic beta-selection. *Nat Immunol* 2010;11:162-70.
50. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (ed4th). Lyon, France: IARC Press; 2008.
51. Jaffe ES, Nicolae A, Pittaluga S. Peripheral T-cell and NK-cell lymphomas in the WHO classification: pearls and pitfalls. *Mod Pathol* 2013;26 Suppl 1:S71-87.
52. Savage NM, Johnson RC, Natkunam Y. The spectrum of lymphoblastic, nodal and extranodal T-cell lymphomas: characteristic features and diagnostic dilemmas. *Hum Pathol* 2013;44:451-71.
53. Kim YJ, Hwang ES, Kim IH, Yu DS. CD4/CD8 double-positive, acute type of adult T-cell leukemia/lymphoma with extensive cutaneous involvement. *Int J Dermatol* 2006;45:1193-5.
54. Foucar K. Mature T-cell leukemias including T-prolymphocytic leukemia, adult T-cell leukemia/lymphoma, and Sezary syndrome. *Am J Clin Pathol*. United States 2007:496-510.
55. Dearden CE. T-cell prolymphocytic leukemia. *Med Oncol* 2006;23:17-22.
56. Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, Kupper TS. Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood*. United States 2010:767-71.



57. Scarisbrick JJ, Whittaker S, Evans AV, Fraser-Andrews EA, Child FJ, Dean A, Russell-Jones R. Prognostic significance of tumor burden in the blood of patients with erythrodermic primary cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2001;97:624-30.
58. Uyttebroeck A, Vanhentenrijk V, Hagemeyer A, Boeckx N, Renard M, Wlodarska I, Vandenberghe P, Depaepe P, De Wolf-Peeters C. Is there a difference in childhood T-cell acute lymphoblastic leukaemia and T-cell lymphoblastic lymphoma? *Leuk Lymphoma* 2007;48:1745-54.
59. Chiaretti S, Foa R. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. Italy 2009;160-2.
60. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 2012;122:3398-406.
61. Fischer S, Mann G, Konrad M, Metzler M, Ebetsberger G, Jones N, Nadel B, Bodamer O, Haas OA, Schmitt K, Panzer-Grumayer ER. Screening for leukemia- and clone-specific markers at birth in children with T-cell precursor ALL suggests a predominantly postnatal origin. *Blood* 2007;110:3036-8.
62. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004;306:269-71.
63. Tosello V, Ferrando AA. The NOTCH signaling pathway: role in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia and implication for therapy. *Ther Adv Hematol* 2013;4:199-210.
64. Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1991;66:649-61.
65. Pear WS, Aster JC, Scott ML, Hasserjian RP, Soffer B, Sklar J, Baltimore D. Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med* 1996;183:2283-91.

66. South AP, Cho RJ, Aster JC. The double-edged sword of Notch signaling in cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2012;23:458-64.
67. Chiang MY, Shestova O, Xu L, Aster JC, Pear WS. Divergent effects of supraphysiologic Notch signals on leukemia stem cells and hematopoietic stem cells. *Blood* 2013;121:905-17.
68. Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, Barnes KC, O'Neil J, Neuberg D, Weng AP, Aster JC, Sigaux F, Soulier J, Look AT, Young RA, Califano A, Ferrando AA. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:18261-6.
69. Wendorff AA, Koch U, Wunderlich FT, Wirth S, Dubey C, Bruning JC, MacDonald HR, Radtke F. Hes1 is a critical but context-dependent mediator of canonical Notch signaling in lymphocyte development and transformation. *Immunity* 2010;33:671-84.
70. Bellavia D, Campese AF, Alesse E, Vacca A, Felli MP, Balestri A, Stoppacciaro A, Tiveron C, Tatangelo L, Giovarelli M, Gaetano C, Ruco L, Hoffman ES, Hayday AC, Lendahl U, Frati L, Gulino A, Screpanti I. Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *Embo j* 2000;19:3337-48.
71. Espinosa L, Cathelin S, D'Altri T, Trimarchi T, Statnikov A, Guiu J, Rodilla V, Ingles-Esteve J, Nomdedeu J, Bellosillo B, Besses C, Abdel-Wahab O, Kucine N, Sun SC, Song G, Mullighan CC, Levine RL, Rajewsky K, Aifantis I, Bigas A. The Notch/Hes1 pathway sustains NF-kappaB activation through CYLD repression in T cell leukemia. *Cancer Cell* 2010;18:268-81.
72. Kang-Decker N, Tong C, Boussouar F, Baker DJ, Xu W, Leontovich AA, Taylor WR, Brindle PK, van Deursen JM. Loss of CBP causes T cell lymphomagenesis in synergy with p27Kip1 insufficiency. *Cancer Cell* 2004;5:177-89.
73. Sarmiento LM, Huang H, Limon A, Gordon W, Fernandes J, Tavares MJ, Miele L, Cardoso AA, Classon M, Carlesso N. Notch1 modulates timing of G1-S progression by inducing SKP2 transcription and p27 Kip1 degradation. *J Exp Med* 2005;202:157-68.

74. Virgilio L, Narducci MG, Isobe M, Billips LG, Cooper MD, Croce CM, Russo G. Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:12530-4.
75. Virgilio L, Lazzeri C, Bichi R, Nibu K, Narducci MG, Russo G, Rothstein JL, Croce CM. Deregulated expression of TCL1 causes T cell leukemia in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3885-9.
76. Gutierrez A, Sanda T, Grebliunaite R, Carracedo A, Salmena L, Ahn Y, Dahlberg S, Neuberg D, Moreau LA, Winter SS, Larson R, Zhang J, Protopopov A, Chin L, Pandolfi PP, Silverman LB, Hunger SP, Sallan SE, Look AT. High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood. United States* 2009;647-50.
77. Pekarsky Y, Zanesi N, Croce CM. Molecular basis of CLL. *Semin Cancer Biol* 2010;20:370-6.
78. Bichi R, Shinton SA, Martin ES, Koval A, Calin GA, Cesari R, Russo G, Hardy RR, Croce CM. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:6955-60.
79. Tabe Y, Konopleva M. Advances in understanding the leukaemia microenvironment. *Br J Haematol* 2014;164:767-78.
80. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol* 2014;24:71-81.
81. Ma S, Shi Y, Pang Y, Dong F, Cheng H, Hao S, Xu J, Zhu X, Yuan W, Cheng T, Zheng G. Notch1-induced T cell leukemia can be potentiated by microenvironmental cues in the spleen. *J Hematol Oncol* 2014;7:71.
82. Miething C, Scuoppo C, Bosbach B, Appelman I, Nakitandwe J, Ma J, Wu G, Lintault L, Auer M, Premsrirut PK, Teruya-Feldstein J, Hicks J, Benveniste H, Speicher MR, Downing JR, Lowe SW. PTEN action in leukaemia dictated by the tissue microenvironment. *Nature* 2014;510:402-6.

## Literaturverzeichnis

---

83. Ashworth TD, Pear WS, Chiang MY, Blacklow SC, Mastio J, Xu L, Kelliher M, Kastner P, Chan S, Aster JC. Deletion-based mechanisms of Notch1 activation in T-ALL: key roles for RAG recombinase and a conserved internal translational start site in Notch1. *Blood* 2010;116:5455-64.
84. Du J, Liu Y, Meline B, Kong G, Tan LX, Lo JC, Wang J, Ranheim E, Zhang L, Chang YI, Ryu MJ, Zhang JF, Zhang J. Loss of CD44 attenuates aberrant GM-CSF signaling in Kras G12D hematopoietic progenitor/precursor cells and prolongs the survival of diseased animals. *Leukemia*. England2013:754-7.
85. Heinig K, Gatjen M, Grau M, Stache V, Anagnostopoulos I, Gerlach K, Niesner RA, Cseresnyes Z, Hauser AE, Lenz P, Hehlhans T, Brink R, Westermann J, Dorken B, Lipp M, Lenz G, Rehm A, Hopken UE. Access to follicular dendritic cells is a pivotal step in murine chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and proliferation. *Cancer Discov* 2014;4:1448-65.
86. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
87. Banchereau J, Pacesny S, Blanco P, Bennett L, Pascual V, Fay J, Palucka AK. Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 2003;987:180-7.
88. Bajenoff M, Glaichenhaus N, Germain RN. Fibroblastic reticular cells guide T lymphocyte entry into and migration within the splenic T cell zone. *J Immunol* 2008;181:3947-54.
89. Uehara S, Grinberg A, Farber JM, Love PE. A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration. *J Immunol* 2002;168:2811-9.
90. Katz FE, Tindle R, Sutherland DR, Greaves MF. Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells. *Leuk Res* 1985;9:191-8.
91. Seki Y, Hayashi, K, Matsumoto A, Seki N, Tsukada J, Ransom J, Naka T, Kishimoto T, Yoshimura A, Kubo M. Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-dependent STAT6 activation and Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13003-8.

92. Lohoff M, Mittrucker HW, Prechtel S, Bischof S, Sommer F, Kock S, Ferrick DA, Duncan GS, Gessner A, Mak TW. Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11808-12.
93. Leonard WJ, Kronke M, Peffer NJ, Depper JM, Greene WC. Interleukin 2 receptor gene expression in normal human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:6281-5.
94. Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:1978-86.
95. Georgescu MM. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer* 2010;1:1170-7.
96. Steelman LS, Franklin RA, Abrams SL, Chappell W, Kempf CR, Basecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Nicoletti F, Libra M, Ruvolo P, Ruvolo V, Evangelisti C, Martelli AM, McCubrey JA. Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. *Leukemia* 2011;25:1080-94.
97. Aster JC, Blacklow SC, Pear WS. Notch signalling in T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies. *J Pathol* 2011;223:262-73.
98. Kluk MJ, Ashworth T, Wang H, Knoechel B, Mason EF, Morgan EA, Dorfman D, Pinkus G, Weigert O, Hornick JL, Chirieac LR, Hirsch M, Oh DJ, South AP, Leigh IM, Pourreyaon C, Cassidy AJ, Deangelo DJ, Weinstock DM, Krop IE, Dillon D, Brock JE, Lazar AJ, Peto M, Cho RJ, Stoeck A, Haines BB, Sathayanayanan S, Rodig S, Aster JC. Gauging NOTCH1 Activation in Cancer Using Immunohistochemistry. *PLoS One* 2013;8:e67306.
99. Dudley DD, Wang HC, Sun XH. Hes1 potentiates T cell lymphomagenesis by up-regulating a subset of notch target genes. *PLoS One* 2009;4:e6678.
100. Wang HC, Perry SS, Sun XH. Id1 attenuates Notch signaling and impairs T-cell commitment by elevating Deltex1 expression. *Mol Cell Biol* 2009;29:4640-52.
101. Sang L, Roberts JM, Collier HA. Hijacking HES1: how tumors co-opt the anti-differentiation strategies of quiescent cells. *Trends Mol Med* 2010;16:17-26.

## Literaturverzeichnis

---

102. Wong GW, Knowles GC, Mak TW, Ferrando AA, Zuniga-Pflucker JC. HES1 opposes a PTEN-dependent check on survival, differentiation, and proliferation of TCRbeta-selected mouse thymocytes. *Blood* 2012;120:1439-48.
103. Curtis DJ, McCormack MP. The molecular basis of Lmo2-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2010;16:5618-23.
104. Varnum-Finney B, Dallas MH, Kato K, Bernstein ID. Notch target Hes5 ensures appropriate Notch induced T- versus B-cell choices in the thymus. *Blood* 2008;111:2615-20.
105. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
106. Reis MD, Mak TW. Monoclonality in human T-cell disorders. *Blood Rev* 1987;1:89-96.
107. Langerak AW, van Den Beemd R, Wolvers-Tettero IL, Boor PP, van Lochem EG, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalpha beta T-cell proliferations. *Blood* 2001;98:165-73.
108. Nascimbeni M, Shin EC, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehermann B. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood* 2004;104:478-86.
109. Zuckermann FA. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;72:55-66.
110. Ghia P, Prato G, Stella S, Scielzo C, Geuna M, Caligaris-Cappio F. Age-dependent accumulation of monoclonal CD4+CD8+ double positive T lymphocytes in the peripheral blood of the elderly. *Br J Haematol* 2007;139:780-90.
111. Harris AW, Pinkert CA, Crawford M, Langdon WY, Brinster RL, Adams JM. The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells. *J Exp Med* 1988;167:353-71.
112. O'Neil J, Calvo J, McKenna K, Krishnamoorthy V, Aster JC, Bassing CH, Alt FW, Kelliher M, Look AT. Activating Notch1 mutations in mouse models of T-ALL. *Blood* 2006;107:781-5.

113. Jeannot R, Mastio J, Macias-Garcia A, Oravecz A, Ashworth T, Geimer Le Lay AS, Jost B, Le Gras S, Ghysdael J, Gridley T, Honjo T, Radtke F, Aster JC, Chan S, Kastner P. Oncogenic activation of the Notch1 gene by deletion of its promoter in Ikaros-deficient T-ALL. *Blood* 2010;116:5443-54.
114. Bailis W, Pear WS. Notch and PI3K: how is the road traveled? *Blood* 2012;120:1349-50.
115. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;140:883-99.
116. Ame-Thomas P, Tarte K. The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin Cancer Biol* 2014;24:23-32.
117. Liu Y, Sattarzadeh A, Diepstra A, Visser L, van den Berg A. The microenvironment in classical Hodgkin lymphoma: an actively shaped and essential tumor component. *Semin Cancer Biol* 2014;24:15-22.
118. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, Fisher RI, Braziel RM, Rimsza LM, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Connors JM, Lansdorp PM, Ouyang Q, Lister TA, Davies AJ, Norton AJ, Muller-Hermelink HK, Ott G, Campo E, Montserrat E, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Yang L, Powell J, Zhao H, Goldschmidt N, Chiorazzi M, Staudt LM. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 2004;351:2159-69.
119. Rehm A, Mensen A, Schradi K, Gerlach K, Wittstock S, Winter S, Buchner G, Dorken B, Lipp M, Hopken UE. Cooperative function of CCR7 and lymphotoxin in the formation of a lymphoma-permissive niche within murine secondary lymphoid organs. *Blood* 2011;118:1020-33.
120. Link A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H, Hinz B, Cyster JG, Luther SA. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol* 2007;8:1255-65.
121. Rehm A, Gatjen M, Gerlach K, Scholz F, Mensen A, Gloger M, Heinig K, Lamprecht B, Mathas S, Begay V, Leutz A, Lipp M, Dorken B, Hopken UE. Dendritic cell-mediated survival

signals in Emu-Myc B-cell lymphoma depend on the transcription factor C/EBPbeta. *Nat Commun* 2014;5:5057.

122. Ni K, O'Neill HC. The role of dendritic cells in T cell activation. *Immunol Cell Biol* 1997;75:223-30.

123. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004;4:540-50.

124. Narducci MG, Scala E, Bresin A, Caprini E, Picchio MC, Remotti D, Ragone G, Nasorri F, Frontani M, Arcelli D, Volinia S, Lombardo GA, Baliva G, Napolitano M, Russo G. Skin homing of Sezary cells involves SDF-1-CXCR4 signaling and down-regulation of CD26/dipeptidylpeptidase IV. *Blood. United States*2006:1108-15.

125. Qiuping Z, Qun L, Chunsong H, Xiaolian Z, Baojun H, Mingzhen Y, Chengming L, Jinshen H, Qingping G, Kejian Z, Zhimin S, Xuejun Z, Junyan L, Jinqun T. Selectively increased expression and functions of chemokine receptor CCR9 on CD4+ T cells from patients with T-cell lineage acute lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 2003;63:6469-77.

126. Qiuping Z, Jei X, Youxin J, Wei J, Chun L, Jin W, Qun W, Yan L, Chunsong H, Mingzhen Y, Qingping G, Kejian Z, Zhimin S, Qun L, Junyan L, Jinqun T. CC chemokine ligand 25 enhances resistance to apoptosis in CD4+ T cells from patients with T-cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia by means of livin activation. *Cancer Res. United States*2004:7579-87.

127. Calderon L, Boehm T. Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:7517-22.

128. Mirandola L, Chiriva-Internati M, Montagna D, Locatelli F, Zecca M, Ranzani M, Basile A, Locati M, Cobos E, Kast WM, Asselta R, Paraboschi EM, Comi P, Chiaramonte R. Notch1 regulates chemotaxis and proliferation by controlling the CC-chemokine receptors 5 and 9 in T cell acute lymphoblastic leukaemia. *J Pathol* 2012;226:713-22.

129. Maser RS, Choudhury B, Campbell PJ, Feng B, Wong KK, Protopopov A, O'Neil J, Gutierrez A, Ivanova E, Perna I, Lin E, Mani V, Jiang S, McNamara K, Zaghlul S, Edkins S, Stevens C, Brennan C, Martin ES, Wiedemeyer R, Kabbarah O, Nogueira C, Histén G, Aster J, Mansour M, Duke V, Foroni L, Fielding AK, Goldstone AH, Rowe JM, Wang YA, Look AT,



Stratton MR, Chin L, Futreal PA, DePinho RA. Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers. *Nature* 2007;447:966-71.

130. Iacovelli S, Hug E, Bennardo S, Duehren-von Minden M, Gobessi S, Rinaldi A, Suljagic M, Bilbao D, Bolasco G, Eckl-Dorna J, Niederberger V, Autore F, Sica S, Laurenti L, Wang H, Cornall RJ, Clarke SH, Croce CM, Bertoni F, Jumaa H, Efremov DG. Two types of BCR interactions are positively selected during leukemia development in the Emu-TCL1 transgenic mouse model of CLL. *Blood* 2015;125:1578-88.

131. Refaeli Y, Young RM, Turner BC, Duda J, Field KA, Bishop JM. The B cell antigen receptor and overexpression of MYC can cooperate in the genesis of B cell lymphomas. *PLoS Biol. United States* 2008:e152.

132. Martins VC, Busch K, Juraeva D, Blum C, Ludwig C, Rasche V, Lasitschka F, Mastitsky SE, Brors B, Hielscher T, Fehling HJ, Rodewald HR. Cell competition is a tumour suppressor mechanism in the thymus. *Nature* 2014;509:465-70.

## **Lebenslauf**

---

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Edward Michaelis, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung der molekularen und zellulären Mechanismen in der Entwicklung einer murinen T-Zell-Leukämie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

### Danksagung

Ganz herzlich möchte ich Frau PD Dr. Uta E. Höpken danken. Sie stand mir in jedem Abschnitt dieses Projektes von der Einarbeitung über die Laborarbeit bis zum Schreiben dieser Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite. Ohne Sie wäre diese Arbeit nie zustande gekommen. Ebenso möchte ich Herrn Dr. Armin Rehm für seine vielen klugen Beiträge danken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich dem SFB633 danken. Zum Einen für die intellektuell bereichernde Teilnahme am IMMUCO Graduiertenkolleg sowie für die finanzielle Unterstützung im Rahmen meines Stipendiums.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe, ganz besonders bei Vanessa Stache, Florian Scholz, Franziska Brand und Marleen Gloger. Nicht nur ihre fachliche Hilfe sondern auch ihre Offenheit und Herzlichkeit haben mir die Arbeit sehr erleichtert. Dank gebührt auch Kerstin Krüger für ihr geduldiges Einführen in die Laborarbeit und ihre vielen praktischen Ratschläge.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie für ihre jahrelange Unterstützung und ganz besonders meiner Mutter für das Korrekturlesen der Arbeit danken.